



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH**

**Escola Superior d'Agricultura de Barcelona**

# **POSTA A PUNT DEL MÈTODE DE PREPARACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE IPRODIONA PER SUCS**

Treball final de grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Eugènia Piqué Munté

Tutor: Montserrat Pujolà Cunill

Juliol / 2020

## Resum

El control de pesticides en els aliments és un repte cada dia més important per les indústries del sector, ja que s'exigeix als seus productes, ja siguin naturals o transformats que no superin els límits màxims permissibles per la legislació. Com aquests mínims són concentracions molt baixes per a poder detectar-les, cal realitzar processos d'extracció acurats i disposar d'instrumental de laboratori adequat per poder arribar a detectar i/o quantificar fins els valors exigibles.

L'objectiu del treball consistirà en trobar mètodes d'operació adequats a les mostres a analitzar (suc de cítrics i fruites de llavor) tant pel que fa al maneig de les mostres, com per a la preparació d'aquestes i parant especial atenció a la posta a punt del cromatògraf gasos-masses de que es disposa per identificar i/o quantificar el fungicida Iprodiona.

Els resultats obtinguts utilitzant el mètode QuEChERS (kit KS0-8911 de Phenomenex), per l'extracció de la Iprodiona i per la separació amb el cromatògraf Agilent 7890 Series amb detector EM 5973 Network, tot i que s'ha treballat intensament en la seva posta a punt i calibració, no han sigut els esperats, ja que no ha estat possible arribar als límits de detecció necessaris per a poder quantificar la Iprodiona. Es van obtenir bons resultats només fins a 3 ppm, estan els nivells exigibles entre 0,1-0,01 ppm. Per tant, no ha estat possible corroborar els resultats obtinguts pels laboratoris externs acreditats (la no presència de pesticides en els productes elaborats).

Com a possible proposta per intentar millorar la validació es podria plantejar la substitució del detector EM per un detector FID ja que és més selectiu.

**Paraules claus:** fungicida, suc de fruita, límits màxims de residus, cromatògraf gasos-espectre de masses.

## Resumen

El control de plaguicidas en los alimentos es un reto cada día más importante para las industrias del sector, ya que se exige a sus productos, ya sean naturales o transformados que no superen los límites máximos permitidos por la legislación. Como estos mínimos son concentraciones muy bajas para poder detectarlas, es necesario realizar procesos de extracción cuidadosos y disponer de instrumental de laboratorio adecuado para poder llegar a detectar y/o cuantificar hasta los valores exigibles.

El objetivo del trabajo consistirá en encontrar métodos de operación adecuados para las muestras a analizar (zumos de cítricos y frutas de semilla) tanto para el manejo de las muestras, como para la preparación de estas y prestando especial atención a la puesta a punto del cromatógrafo gases-masas del que se dispone para identificar y/o cuantificar el fungicida Iprodiona.

Los resultados obtenidos utilizando el método QuEChERS (kit KS0-8911 de Phenomenex), adecuado para la extracción de Iprodiona y separación con el cromatógrafo Agilent 7890 Series con detector EM 5973 Network, aunque se trabajó intensamente en su puesta a punto y calibración, no fueron los esperados, ya que no fue posible alcanzar los límites de detección necesarios para poder cuantificar la Iprodiona. Se obtuvieron buenos resultados solo hasta 3 ppm, siendo los niveles exigibles entre 0,1-0,01 ppm. Por lo tanto, no fue posible corroborar los resultados obtenidos por los laboratorios externos acreditados (la no presencia en los productos elaborados).

Como posible propuesta para intentar mejorar la validación se puede planear la sustitución del detector EM por un detector FID ya que es más selectivo.

**Palabras clave:** plaguicidas, zumos de fruta, límites máximos de residuos, cromatógrafo gases-espectro. de masas.

## Abstract

The control of pesticides in food is an increasingly important challenge for the industries of the sector, since its products are required, whether natural or processed, that do not exceed the maximum limits allowed by legislation. Since these minimum amounts are in very low concentrations to be able to detect them, it is necessary to carry out careful extraction processed and to have adequate laboratory instruments to be able to detect and/or quantify up to the required values.

The objective of the work will be to find suitable operating methods for the samples to be analyzed (citrus juices and seed fruit) both for handling the samples and preparing them, as well as paying special attention to setting up the gas-mass chromatograph available to identify and/or quantify the fungicide Iprodione.

The results obtained using the QuEChERS method (kit KS0-8911 from Phenomenex), suitable for the extraction of the Iprodione and separation with the Agilent 7890 Series chromatograph with EM 5973 Network detector, although intensive work was done on their set-up and calibration, they were not expected ones, since it was not possible to reach the detection limits necessary to quantify Iprodione. Good results were obtained only up to 3 ppm, with the required levels being between 0.1-0.01 ppm. Therefore, it was not possible to corroborate the results obtained by accredited external laboratories (the lack presence in the processed products).

As a possible proposal to try to improve the validation, the replacement of the EM detector by an FID detector can be planned since it is more selective.

**Keywords:** pesticides, fruit juices, maximum residue limits, gas-mass spectrum chromatograph.

## Sumari

<b>ÍNDEX DE FIGURES.....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDEX DE TAULES .....</b>	<b>6</b>
<b>SÍMBOLS I ACRÒNIMS .....</b>	<b>7</b>
<b>AGRAÏMENTS.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>9</b>
1.1. ORGANITZACIONS QUE INTERVENEN PER A FIXAR ELS LÍMITS MÀXIMS PERMESOS DE RESIDUS DE PESTICIDES. ....	10
1.1.1. <i>Organitzacions</i> .....	11
1.1.2. <i>Reglamentació</i> .....	12
1.2. PESTICIDES PRINCIPALS QUE ES PODEN TROBAR EN FRUITS I SUCS DE TARONJA, POMA, PERA I PRÉSSEC .....	15
1.3. MÈTODES DE QUANTIFICACIÓ DE PLAGUICIDES PROPOSATS PER LA EURL .....	17
<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>22</b>
<b>3. DISSENY EXPERIMENTAL.....</b>	<b>23</b>
<b>4. MATERIALS, APARELLS I MÈTODES.....</b>	<b>24</b>
4.1. MATERIALS.....	24
a) <i>Fruïta</i> .....	24
4.2. APARELLS .....	26
4.3. MÈTODES ANALÍTICS.....	27
4.3.1. <i>Extracció de la mostra mitjançant el kit de QuEChERS</i> .....	27
4.3.2. <i>Elecció del mètode utilitzat per analitzar la Iprodiona</i> .....	29
4.3.3. <i>Procediment per a la preparació de la recta de calibració de la Iprodiona</i> . ....	32
<b>5. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>34</b>
5.1. PRESA DE CONTACTE I MANTENIMENT DE L'EQUIP CROMATOGRÀFIC AGILENT 6890.....	35
5.2. AUTOAPRENENTATGE SOBRE EL FUNCIONAMENT DEL CROMATÒGRAF DE GASOS, DETECTOR SELECTIU DE MASSES I INJECTOR.....	38
5.2.1. <i>Parts de l'equip cromatògraf i situació dins l'aparell</i> .....	38
5.2.2. <i>Tunne &amp; Vacunn pel control dels paràmetres del cromatògraf-EM</i> .....	39
5.2.3. <i>Programació de l'ordinador per analitzar una mostra</i> .....	43
5.2.4. <i>Injecció de la mostra</i> .....	44
5.2.5. <i>Funcionament del programa "Data Analysis"</i> .....	44
5.3. DIFICULTATS DEL PROCÉS OPERANT AMB ELS EQUIPS DE TREBALL I POSSIBLES SOLUCIONS.....	45
5.4. CALIBRACIÓ DEL PATRÓ D'IPRODIONA .....	47
5.4.1. <i>Informació del document imprès</i> .....	47
5.4.2. <i>Comparació dels resultats dels patrons 10, 5, 4, 3, 2 i 1 ppm</i> .....	50
5.5. ASSAJOS D'EXTRACCIÓ AMB MOSTRES DE FRUITES .....	55
<b>6. CONCLUSIONS.....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>57</b>

## Índex de figures

Figura 1.- Ordre de prioritat de les diferents organitzacions en la legislació sobre el límit màxim de residus.....	10
Figura 2.- Ordre del procés experimental.....	23
Figura 3.- Aparell de cromatografia de gasos acoblat a espectrometria de masses.....	26
Figura 4.- Ordre de preparació de la solució mare i les dilucions.....	33
Figura 5.- Informe de resultats dels paràmetres de l'Autotune.....	41
Figura 6.- Informe dels resultats del Tune Evaluation.....	42
Figura 7.- a/ perfil cromatogràfic del patró 10 ppm Iprodiona.....	47
Figura 7.- b/ espectre de masses del patró de 10 ppm Iprodiona.....	48
Figura 8. Espectre de masses de la mostra patró de 4 ppm.....	48
Figura 9.- a/ formula i b/Sinònims Iprodiona per al patró 10 ppm en l'espectre de masses.....	49
Figura 10.- Perfil cromatogràfic dels patrons de a/ 10 ppm, b/ 5 ppm, c/ 4 ppm.....	51
Figura 11.- Perfil cromatogràfic dels patrons de d/ 3 ppm, e/ 2 ppm i f/ 1 ppm.....	52
Figura 12.- Espectre de masses dels patrons de a/ 10 ppm, b/ 5 ppm, c/ 4 ppm.....	53
Figura 13- Espectre de masses dels patrons de d/ 3 ppm, e/ 2 ppm i f/ 1 ppm.....	54

## Índex de taules

Taula 1.- Límits Màxims de Residus permesos d'acord amb el reglament (CE) No 396/2005 per a diferents fruites: taronja, poma, pera i préssec.....	13
Taula 2.- Legislació dels plaguicides d'interès d'acord amb el reglament (CE) No 396/2005.....	14
Taula 3.- Pesticides presents segons la PAN per al fruit i suc de taronja, poma, pera i préssec.....	16
Taula 4.- Mètodes emprats per l'anàlisi de pesticides.....	18
Taula 5.- Característiques físico-químiques de la Iprodiona.....	25
Taula 6.- Relació d'aigua necessària per la mostra.....	28
Taula 7.- Paràmetres cromatogràfics del cromatògraf de gasos-espectre de masses.....	30
Taula 8.- Rampa de temperatures del forn utilitzades per dur a terme la separació.....	30
Taula 9.- Paràmetres d'adquisició i monitoreig selectiu.....	32
Taula 10.- Resultats de probabilitat de Iprodiona en diferents àrees de tots els patrons analitzats.....	50

## Símbols i acrònims

ADR: Acord Europeu Relatiu.

CE: Comissió Europea.

CCA: Comissió del Codex Alimentarius.

CCPR: Comitè del Codex sobre Residus de Plaguicides.

CEE: Comunitat Econòmica Europea.

d-SPE: Extracció per Fase Sòlida Dispersiva.

EEE: Espai Econòmic Europeu.

EFSA: European Food Safety Authority.

EM: Espectrometria de Masses.

EURL: Reference Laboratories for Residues of Pesticides.

EURLs-FV: Reference Laboratories for Residues of Pesticides- Fruits and Vegetables.

FAO: Food and Agriculture Organization.

FID: Flame Ionization Detection.

GC: Gas Chromatography.

GC-QqQ/MS/MS: Cromatografia de gasos - espectròmetre de massa triple quadrupol – masses/masses.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

JMPR: Reunió Conjunta sobre Residus de Plaguicides.

LC: Liquid Chromatography.

LC-QqQ/MS/MS: Cromatografia de líquids – espectrometria de massa triple quadrupol – masses/masses.

LMR: Límits Màxims de Residus.

LVL: Lowest Level Validated.

MACP: Programes de Control Plurianual de Residus de Plaguicides.

MRM: Monitoreig de Reaccions Múltiples.

MSD: Detector Selectiu de Masses.

OMS: Organització Mundial de la Salut.

ONU: Organització de les Nacions Unides.

ONUAA: Organització de les Nacions Unides per l'Agricultura i l'Alimentació.

PAN: Pesticide Action Network.

ppm: Parts Per Milió.

PSA: Amina Primària/Secundària

QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe.

UE: Unió Europea.



## Agraïments

En primer lloc, agrair a la meva tutora, per haver-me fet el seguiment d'aquest projecte. M'ha sabut guiar en tot moment i ensenyar-me noves referències que han sigut de gran ajuda per al treball.

En segon lloc agrair a l'empresa, Nufri S.A.T., la possibilitat de realitzar aquest TFG.

Per últim, gràcies a la meva família i amics que han suposat en tot moment un suport moral molt important, ajudant-me a superar els reptes a nivell psicològic que un projecte com aquest, comporta en si mateix.

# 1. INTRODUCCIÓ

És pràctica habitual, en l'agricultura industrial l'ús de pesticides per tal d'evitar la proliferació de plagues que puguin afectar i malmetre els conreus. L'ús incorrecte d'aquests productes pot perjudicar directament la salut humana amb el risc que quedin exposats a substàncies químiques nocives a través dels residus que queden després del cultiu. El fet de limitar els nivells màxims d'aquests residus dona una garantia de innocuïtat dels aliments que es consumeixen.

Els Límits Màxims de Residus (LMR), segons l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària, (EFSA: European Food Safety Authority) es descriu com "*els nivells més alts de residus de plaguicides permesos legalment en aliments i pinsos*"[1]. Aquest límit, calculat sobre la base de bones pràctiques agrícoles i el principi de la menor exposició possible per protegir als consumidors més vulnerables, s'obté després d'una avaluació completa de les propietats de la substància activa i els usos previstos del plaguicida.

Totes les qüestions relacionades amb els límits legals per als residus de plaguicides en els aliments i pinsos estan regulades pel Reglament de la Comissió Europea (CE) nº 396/2005[2].

Per poder assegurar que un aliment no sobrepassa aquests límits, es necessari disposar de tècniques analítiques acurades que permetin detectar i/o quantificar els nivells exigits per la llei.

## 1.1. Organitzacions que intervenen per a fixar els límits màxims permesos de residus de pesticides.

A continuació es fa un breu resum de l'ordre de més importància a menys de les organitzacions implicades que intervenen en la decisió de fixar uns límits màxims permesos, i perquè fer-ho, en els pesticides.

(Figura 1)

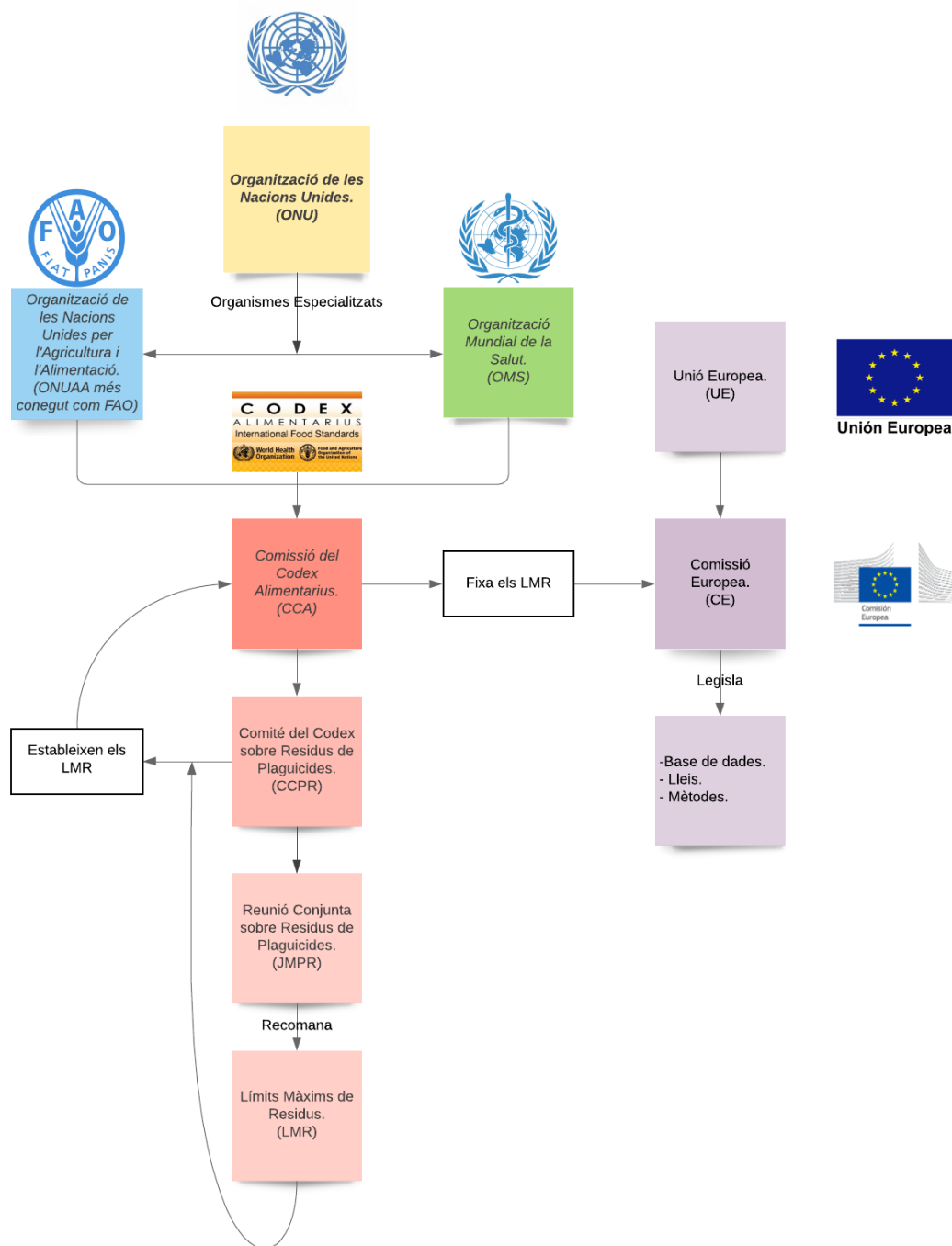


Figura 1.- Ordre de prioritat de les diferents organitzacions en la legislació sobre el límit màxim de residus.[3]

### 1.1.1. Organitzacions

A continuació es fa un breu resum de les prioritats de cadascuna de les organitzacions descrites a la figura 1.

L'**Organització Mundial de la Salut** (OMS) defineix els plaguicides com:

*“Qualsevol substància o barreja de substàncies, de caràcter orgànic o inorgànic, que està destinada a combatre insectes, àcars, rosegadors, i altres espècies indesitjables de plantes i animals que interfereixin en l’elaboració, emmagatzematge, transport o comercialització d’aliments, producció d’aliments, productes agrícoles, fustes i productes de fustes o aliments per animals. També aquells que poden administrar-se als animals per combatre insectes, aranyes o altres plagues dins o sobre els seus cossos”[4].*

En l’OMS, s’elaboren especificacions de plaguicides amb la finalitat d’establir unes normes de qualitat per als plaguicides i protegir als consumidors, i al medi ambient en l’ús de productes de qualitat deficient. Té la responsabilitat i potestat de marcar les directives sanitàries a tot el món, també dins de la Unió Europea.

L’organisme **Organització de les Nacions Unides per l’Alimentació i l’Agricultura**, (ONUAA), o més coneguda com **FAO** per les seves sigles en anglès: Food and Agriculture Organization, dirigeix les activitats internacionals encaminades a eradicar la gana al món. La FAO pretén obtenir la millora de la seguretat alimentària elevat els nivells de nutrició, la productivitat agrícola, les condicions de la població rural, i contribuint a l’expansió de l’economia mundial[5].

La FAO i la OMS tenen la responsabilitat sobre la **Reunió Conjunta de Residus de Plaguicides**, conegut com JMPR per les seves sigles amb anglès: Joint Meeting on Pesticide Residues[6]. Aquesta reunió s’encarrega d’examinar la pertinent informació toxicològica i dades obtingudes principalment a partir d’assajos supervisats, que reflecteixin l’ús del plaguicida aprovat de conformitat amb les bones pràctiques agrícoles.

El **Comitè del Codex sobre Residus de Plaguicides** (CCPR) és l’encarregat d’establir els límits màxims de residus (LMR) fixats pel Codex per a residus de plaguicides en aliments específics o en grups d’aliments o pinsos que circulen en el comerç internacional per tal de protegir la salut dels consumidors. El Codex ha establert més de 4300 LMR que afecten a quasi 200 plaguicides[7].

### 1.1.2. Reglamentació

Definits els diferents organismes implicats a nivell mundial en la fixació dels LMR, a continuació s'explica el marc europeu que legisla a partir d'aquests límits.

La **Comissió Europea** (CE) és una de les set institucions de la **Unió Europea** (UE). Mostra el poder executiu i la iniciativa legislativa. S'encarrega de proposar legislació, aplicar les decisions comunitàries, defensar els tractats de la Unió i en general s'ocupa dels assumptes diaris de la UE.

Els Límits Màxims de Residus es poden trobar en la pàgina web de la Comissió Europea[8]; dins l'apartat de **Laboratoris de Referència per Residus de Plaguicides**, o EURL per la seva abreviatura en anglès Reference Laboratories for Residues of Pesticides, on s'hi poden trobar diferents enllaços d'interès com: bases de dades, legislació vigent i llistat de mètodes científics a aplicar.

Respecte la legislació per als LMR està en vigor el següent reglament on la darrera modificació i la versió està consolidada al 08/10/2019[9]:

Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo Texto pertinente a efectos del EEE.

En aquest treball ens centrarem majoritàriament en aquells reglaments que fan referència a: taronja, poma, pera i préssec. **(Taula 1)**

**Taula 1.- Límits Màxims de Residus permesos d'acord amb el reglament (CE) No 396/2005 per a diferents fruites: taronja, poma, pera i préssec[10].**

Categoria	Número codi categoria	Número de codi	Grup	R e s i d u s  d e  p l a g u i c i d e s	LMR (mg/Kg)								
					Tiabendazol	Imazalil	Piriproxifén	Fosmet	Fludioxonil	Iprodiona	Clorpirifos	Captan	2-Fenilfenol
Fruita fresca o congelada; fruits secs	100000	110000	Cítrics		7	5	0,6	0,5	10	0,01*	1,5	0,03	10
		110020 (A)	Taronja										
		0110020-002 (B)	Taronges amargues/agries										
Fruita fresca o congelada; fruits secs	100000	130000	Fruites de pepita		4	2	0,2	0,5	5	0,01*	0,01*	10	0,01*
		130010 (A)	Poma										
		0130010-001 (B)	Pomes silvestres										
Fruita fresca o congelada; fruits secs	100000	130000	Fruites de pepita		4	2	0,2	0,5	5	0,01*	0,01*	10	20
		130020 (A)	Pera										
		0130020-002 (B)	Peres silvestres										
Fruita fresca o congelada; fruits secs	100000	140000	Fruites d'os		0,01*	0,05*	0,5	1	10	0,01*	0,08	6	0,01*
		140030 (A)	Préssec										
		0140030-001 (B)	Paraguayos										
		0140030-002 (B)	Nectarines										

(A): Producte principal del grup o subgrup.

(B): Altres productes als quals s'apliquen els mateixos LMR.

\*: Indica límit inferior de detecció analítica.



Les taules 1 i 2 estan directament relacionades. Les legislacions de la taula 2 estan dins del reglament (CE) NO 396/2005 on es regulen els límits màxims de residus de cada pesticida.

En la taula 2 podem observar en la primera columna, el nom dels plaguicida d'interès. Segueix la segona columna amb els reglaments que estan establerts actualment i modificats sota el reglament 396/2005. En cadascun d'aquests reglaments s'indica l'annex on hi ha els LMR per als plaguicides. Finalment en l'última columna s'hi troba les anteriors modificacions del reglament 396/2005 i els darrers als de la columna de legislació.

**Taula 2.- Legislació [11] dels plaguicides d'interès d'acord amb el reglament (CE) No 396/2005.**

Residu plaguicida	Legislacions modificades del Reg. 396/2005	Història
Tiabendazol	Reg. (EU) 2017/1164 Aplicable des de 21/01/2018 Annex II	Reg. (EC) No 149/2008
Imazalil	Reg. (EU) 2020/856 Aplicable des de 16/04/2020 Annex II	Reg. (EU) 2019/1582 Reg. (EU) No 750/2010 Reg. (EC) No 839/2008 Reg. (EC) No 149/2008
Piriproxifén ( L )	Reg. (EU) 2016/1902 Aplicable des de 24/11/2016 Annex III, part A	Reg. (EU) No 737/2014 Reg. (EC) No 839/2008 Reg. (EC) No 149/2008
Fosmet ( R )	Reg. (EU) No 737/2014 Aplicable des de 30/07/2014 Annex III, part A	Reg. (EU) No 293/2013 Reg. (EU) No 592/2012 Reg. (EC) No 839/2008 Reg. (EC) No 149/2008
Fludioxonil ( L ) ( R )	Reg. (EU) 2020/856 Aplicable des de 18/11/2019 Annex II	Reg. (EU) 2019/1791 Reg. (EU) 2016/1902 Reg. (EU) 2016/1003 Reg. (EU) 2015/845 Reg. (EU) No 491/2014 Reg. (EU) No 79/2014 Reg. (EU) No 834/2013 Reg. (EU) No 241/2013 Reg. (EU) No 441/2012 Reg. (EU) No 813/2011 Reg. (EU) No 750/2010 Reg. (EC) No 822/2009 Reg. (EC) No 256/2009 Reg. (EC) No 839/2008 Reg. (EC) No 149/2008
Iprodiona ( R )	Reg. (EU) 2019/38 Aplicable des de 31/07/2019 Annex V	Reg. (EU) 2015/400 Reg. (EC) No 149/2008
Clorpirifos ( L )	Reg. (EU) 2018/686 Aplicable des de 05/12/2018 Annex II	Reg. (EU) 2016/60 Reg. (EC) No 839/2008 Reg. (EC) No 149/2008
Captan ( R )	Reg. (EU) 2019/1015 Aplicable des de 11/07/2019 Annex II	Reg. (EU) No 2016/452 Reg. (EU) No 251/2013 Reg. (EU) No 592/2012 Reg. (EU) No 978/2011 Reg. (EU) No 559/2011 Reg. (EC) No 149/2008
2-Fenilfenol ( R )	Reg. (EU) 2018/78 Aplicable des de 08/08/2018 Annex II	Reg. (EU) No 737/2014 Reg. (EU) No 34/2013 Reg. (EC) No 304/2010

**Font .- Comissió Europea, 2016.**

(L): Liposoluble. (R) : La definició del residu difereix per les següents combinacions de plaguicida – número de codi:

- Fosmet: Fosmet – Codi 1000000, excepte 1040000.
- Fludioxonil: Fludioxonil – Codi 1000000, excepte 104000: suma de fludioxonil i els seus metabòlits oxidats al metabòlit àcid 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-4-carboxilic.
- Iprodiona: Iprodiona – Codi 1000000, excepte 1040000: suma de iprodiona i tots els metabòlits que continguin la part de 3,5-dicloroanilina expressada com iprodiona.
- Captan: Captan – Codi 1000000, excepte 1040000: suma de THPI, 3-OH THPI i 5-OH THPI, expressada com captan; codi 0151020.
- 2-Fenilfenol: 2-Fenilfenol – Codi 1000000, excepte 1040000.

## 1.2. Pesticides principals que es poden trobar en fruits i suc de taronja, poma, pera i préssec

PAN (Pesticide Action Network) ens facilita una web molt útil on es pot observar quins pesticides són més comuns en les diferents fruites i hortalisses: “What’s on my food?”

Les taules de dades que es mostren a continuació han sigut extretes de la web “What’s on my food?” presentada per la PAN [12].

S’ha fet recerca sobre: suc de poma, poma, suc de taronja, taronja, suc/purè de pera, pera i préssecs (suc de préssec no si ha trobat). **(Taula 3)**

Cal destacar que en el camp hi ha un contingut més alt de pesticides, ja que és on s’addiciona directament el producte químic per a la protecció de la collita i per tal de millorar també el control de plagues. En canvi, el fruit no deu presentar teòricament tal contingut químic ja que, sempre és necessari aplicar un marge de seguretat entre el temps d’aplicació i la collita i per altra banda, al arribar a fàbrica a aquests fruits se’ls sotmet a un procés de neteja i desinfecció que poden servir per reduir el seu contingut.



**Taula 3.- Pesticides presents segons la PAN per al fruit i suc de taronja, poma, pera i préssec.**

Freqüència d'aparició (%) Fruit	Freqüència d'aparició (%) Suc	Fruit taronja	Suc taronja	Freqüència d'aparició (%) Fruit	Freqüència d'aparició (%) Suc	Fruit poma	Suc poma	Freqüència d'aparició (%) Fruit	Freqüència d'aparició (%) Suc	Fruit pera	Suc pera	Freqüència d'aparició (%) Fruit	Fruit préssec
0,3	11,3	Carbaryl		17,3	32,7	Carbendazim (MBC)		3,5	38,1	Phosmet		47,6	Fludioxinil
50	8,6	Thiabendazole		16,7	31,1	Tetrahydrophtalimide (THPI)		X	36,5	Thiabendazole		31,1	Iprodione
X	8	Carbendazim (MBC)		81	20,7	Thiabendazole		0,1	22,2	Tebufenozide		30,6	Phosmet
69,2	7,6	Imazalil		28,7	19,1	Acetamiprid		26,5	22,2	o-Phenylphenol		25,6	Azinphos methyl
X	0,9	o-Phenylphenol		82,2	13,5	Diphenylamine (DPA)		7,6	22,2	Azinphos methyl		22,9	Cyhalothrin, Lambda
X	0,3	Pyriproxyfen		12,7	11	Thiacloprid		3,8	7,9	Imidacloprid		19,4	Spinosad A
-	-	-		2,4	3,1	Carbaryl		X	7,9	Fenpropathrin		-	-
-	-	-		75,2	1,5	Pyrimethanil		0,1	6,3	Omethoate		-	-
-	-	-		12,7	0,5	Boscalid		X	4,8	Carbaryl		-	-
-	-	-		X	0,5	Phosalone		0,1	3,2	Dimethoate		-	-
-	-	-		0,9	0,5	o-Phenylphenol		6,1	1,6	Diphenylamine (DPA)		-	-
-	-	-		X	0,3	1-Naphtol		-	-	-		-	-
-	-	-		9,6	0,3	Phosmet		-	-	-		-	-

Font .- PAN, 2014.



**Observacions de la taula 3:**

- S'ha elaborat un petit estudi on es compara el producte fresc i el producte en suc. En aquesta comparació s'ha escollit els pesticides, que segons la PAN, i són més presents. En aquest cas s'ha volgut aprofundir preferentment en els suc i és per això que entre els dos productes s'agafen els valors de major presència en percentatge del producte suc. A la vegada s'introdueix el % del pesticida que s'ha agafat per al suc, per al producte fresc.
- En el suc de taronja hi ha 6 pesticides que són els que normalment s'hi troben més presents, pel contrari en el fruit de les taronges són 12 els pesticides presents i només tres coincideixen.
- Hi ha 13 pesticides que apareixen en el suc de poma, comparo amb les pomes (fruit), si aquests mateixos pesticides també hi són. Coincideixen 11 pesticides. En el cas del fruit hi ha fins a 47 pesticides.
- En el cas del suc/purè de pera el nombre de pesticides es de 11. Pel contrari en el fruit de pera els pesticides que més s'hi troben són un total de 40. Dels 11, 8 coincideixen.
- En els préssecs, la pàgina web consultada no facilita la informació del suc de préssec. Hi ha un total de 62 pesticides en la fruita de préssec dels quals els més abundants són els sis que hi ha en la taula.

**1.3. Mètodes de quantificació de plaguicides proposats per la EURL**

La llista de cerca de mètodes EURL (Reference Laboratories for Residues of Pesticides) resumeix els informes de validesa EURL, els informes de convalidació i els informes d'observació analítica dels compostos inclosos en els reglaments de **Programes de Control Plurianual de Residus de Plaguicides** MACP i MACD-WDs[13].

**Taula 4.- Mètodes emprats per l'anàlisi de pesticides.**

Residu plaguicida	Mètode	GC	LC	EURLs-FV
Tiabendazole	MRM	Difícil	Si	FV 2010-M1, FV 2010-M4, FV 2014-M12, FV 2014-M16
Imazalil		Difícil	Si	FV 2010-M1, FV 2010-M4, FV 2014-M12, FV 2014-M16
Piriproxifén		Si	Si	FV 2010-M1, FV 2010-M3, FV 2010-M4, FV 2014-M12, FV 2014-M15, FV 2014-16
Fosmet		Si	Si	FV 2010-M1, FV 2014-M12 FV 2014-M16
Fludioxonil		Si	Si	FV 2010-M1, FV 2010-M4, FV 2014-M12, FV 2014-M16
Iprodiona		Difícil	Difícil	FV 2010-M1, FV 2014-M12, FV 2014-M15, FV 2014-M16
Clorpirifos		Si	Si	-
Captan		Difícil	No	-
2-Fenilfenol		Si	Si	FV 2010-M3, FV 2014-M12

Font .- EURL, 2010.

MRM: Monitorització de reaccions múltiples. Dins dels diferents mètodes que es pot utilitzar hi ha els de residus individuals i els MRM. Aquests últims analitzen els compostos seleccionats en tots els productes alimentaris segons la definició de residu. És un mètode que permet proporcionar anàlisis quantitatius i qualitatius de traces d'analits en matrius de gran complexitat. L'objectiu analític habitual és fixar el LVL (nivell més baix validat) a 0,01 mg/Kg en diferents productes, però representatius.

GC: Cromatografia de Gasos.

LC: Cromatografia de Líquids.

EURLs-FV: Laboratoris de referencia de la Unió Europea per a Residus de Pesticides – Fruites i Verdures.

**Breu descripció dels diferents mètodes d'anàlisis multiresidus:**

- a) **FV 2010-M1: Mètode multiresidu mitjançant QuEChERS seguit de GC-QqQ/MS/MS (Cromatografia de gasos - espectròmetre de massa triple quadrupol – masses/masses) i LC-QqQ/MS/MS (Cromatografia líquida – espectrometria de massa triple quadrupol – masses/masses) per a fruites i verdures**[14].
- Fruits/verdures amb les que es treballa: alvocat, pastanaga, taronja i pebre.
  - Procediment: la mostra homogeneïtzada s'extreu amb acetonitril. Després d'afegir sals (sulfat de magnesi anhidre, clorur de sodi, citrat trisòdic d'hidratat i hidrocitrat de disodi sesquihidratat), la mescla s'agita intensament i es centrifuga per a separar la fase orgànica de l'aquosa. Es pren una alíquota de la fase orgànica per a la neteja amb sorbents a granel de Amina Primària/Secundària(PSA; Remou àcids orgànics, àcids grassos, sucres i pigments de antocianina) i MgSO<sub>4</sub> anhidre per eliminar l'aigua residual. Els extractes s'agiten en un vòrtex i es dilueix una petita alíquota amb acetonitril.
  - Mètode de validació: es realitza per a concentracions de; 0,10 mg/Kg i 0,01 mg/Kg. Per a cada producte, es van analitzar cinc mostres en cadascuna de les concentracions assajades i un blanc.
- b) **FV 2010-M3: Mètode multiresidus amb Mini-Luke seguit de GC-QqQ-MS/MS (Cromatografia de gasos – espectrometria de massa triple quadrupol – masses/masses) per a fruites i verdures**[15].
- Fruits/verdures amb les que es treballa: raïm, taronja i tomàquet.
  - Procediment: la mostra homogènia s'extreu amb acetona i seguidament amb diclorometà/éter de petroli (1:1). La mescla es centrifuga i l'alíquota de l'extracte es concentra fins a la sequedat. El residu es redissolt amb ciclohexà / acetona (9:1) i s'injecta en GC-MS/MS.
  - Mètode de validació: es va realitzar les concentracions de 0,50 mg/Kg i 0,05 mg/Kg. Per a cada producte es van analitzar cinc mostres i un blanc en cada nivell.
- c) **FV 2010-M4: Anàlisi de residus de plaguicides en fruites i hortalisses amb extracció d'acetat d'etil mitjançant cromatografia gas i líquid amb detecció espectromètrica de massa**[16].
- Fruits/verdures amb les que es treballa: taronja, panses i porro.
  - Procediment: és un mètode per a diversos residus basat en l'extracció amb acetat d'etil seguit de determinació de LC i GC. A partir de la mostra homogeneïtzada es fa una

extracció amb metanol. S'addiciona hidrogen carbonat de sodi per millorar la neteja i recuperació dels pesticides.

- Mètode de validació: el límit de quantificació (LOQ) del mètode és de 0,01 mg/kg per la majoria dels analits. La validació del mètode es va realitzar amb cinc valors de recuperació a dos nivells de concentració; 0,01 i 0,05 mg/Kg.
- d) FV 2014-M12: Mètode d'extracció Mini-Luke ("NL-") seguit de LC i GC-MS/MS (Cromatografia líquida i Cromatografia de Gasos – Masses/Masses) per a l'anàlisi de diversos residus de pesticides en fruites i verdures[17].**
- Fruits/verdures amb les que es treballa: enciam i taronja.
  - Procediment: la mostra homogeneïtzada es barreja amb una solució estàndard de metanol. Per a la validació del mètode, la solució de pesticides es prepara en toluè o metanol. Finalment per al mètode de l'extracció es fa amb acetona i es divideix amb èter de petroli i diclorometà. L'extracció obtinguda s'analitza per GC-MS/MS i LC-MS/MS.
  - Mètode de validació: el mètode de validació es realitza a tres nivells de concentració; 0,005, 0,01 i 0,02 mg/Kg. S'analitzen sis rèpliques per a cada nivell.
- e) FV 2014-M15: Anàlisi de pesticides en fruites i hortalisses mitjançant cromatografia líquida microflow-espectrometria de masses[18].**
- Fruits/verdures amb les que es treballa: tomata, pebre i taronja.
  - Procediment: les mostres s'extreuen amb el procediment de QuEChERS. S'utilitzen estàndards interns dichlorvos-d6 i malathion-d10 per comprovar la recuperació. Linuron-d6 i Dimethoate-d6 s'utilitzen per a la dilució i injecció de les mostres al sistema microflow-LC-MS. L'extracte diluït s'analitza injectant 3 µL al sistema microflow-LC-ESI-QqQ-MS.
  - Mètode de validació: el mètode de validació es realitza amb concentracions de 0,05 i 0,005 mg/Kg.
- f) FV 2014-M16: Mètode d'alta massa de precisió per al cribratge d'una àmplia gamma de pesticides en diferents matrius vegetals i fruiters[19].**
- Fruits/verdures amb les que es treballa: tomata, pebre, taronja i té verd.
  - Procediment: S'avalua l'anàlisi de pesticides realitzant extracte de QuEChERS de tomàquet, pebre, taronja i té verd. Els extractes es barregen amb 170 pesticides seleccionats a quatre nivells diferents de concertació. Aquests es dilueixen 5 vegades

abans de la injecció. L'informe presenta paràmetres de treball del sistema LC-MS i base de dades dels pesticides investigats.

- Mètode de validació: No s'especifica el mètode de validació però el rang per a realitzar-ho té que estar entre 0,1-0,005 mg/kg com en els casos anteriors.

Com es pot veure en aquest recull de mètodes, els nivells de detecció i/o quantificació de pesticides són molt baixos i en general oscil·len entre les concentracions de 0,1 i 0,005 mg/kg de fruita; la qual cosa requereix una preparació i extracció de mostra molt acurades per evitar pèrdues i/o contaminacions del material emprat, de l'ús de tècniques de separació i detecció potents i d'una elevada precisió i recuperació.

## 2. Objectius

Aquest treball té com a principal objectiu la posta a punt d'un cromatògraf de gasos - EM per el seu ús en la determinació de Iprodiona en suc de taronja, poma, pera i préssec.

El motiu d'estudiar la Iprodiona, és principalment, per interès per part de l'empresa Nufri S.A.T. on es va realitzar el treball final de grau, ja que és un fungicida que requeria d'unes mesures de seguretat modificades per la comissió i que calia assegurar que no estigués present o que si hi es estigui per sota dels LMR en els fruits.

Per tal d'aconseguir-ho es definiran els següents objectius específics:

- Posar a punt l'equip de cromatografia de gasos que disposa l'empresa a partir del seu manteniment.
- Intentar aconseguir detectar amb l'equip cromatògraf Agilent 7890 Series, posat a punt un mínim de 0,01 ppm de Iprodiona.
- Determinar la presència/absència de Iprodiona en una mostra d'assaig.
- Adaptar el mètode de preparació de la mostra al cas a estudiar.
- Adaptar el mètode de quantificació per CG-EM per a la determinació de Iprodiona.

### 3. Disseny experimental

En aquest esquema (**Figura 2**) es mostra el disseny experimental del procés des de que es prepara la mostra fins l'anàlisi de l'analit, en el cromatògraf de gasos-masses.



Figura 2.- Ordre del procés experimental.



## 4. Materials, aparells i mètodes

La metodologia es basa en el mètode d'extracció de QuEChERS. L'anàlisi és realitzat per cromatografia de gasos/espectrometria de masses amb un analitzador quàdruple simple.

L'objectiu principal és determinar la presència o absència d'un compost en una mostra d'assaig a una concentració superior,  $> 0,01$  ppm, a la del límit establert.

### 4.1. Materials

#### a) Fruita

La idea principal del treball era treballar amb diferents fruites, les més comunes en l'empresa són: taronja, poma, pera i préssec procedents directament del camp. Per cadascuna d'elles s'agafa una mostra representativa de dos kilograms i es guarda a la nevera fins començar l'anàlisi.

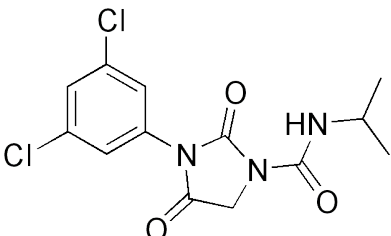
#### b) Iprodiona

Per la posta a punt de l'aparell existent a l'empresa, s'ha seleccionat en concret el fungicida Iprodiona, aquest ha estat escollit degut a la presència durant el darrer any en algun producte.

En concret es va treballar amb un patró de la marca "Sigma-Aldrich" 36734-19-7 i una puresa segons les especificacions de  $\geq 98.0$  % i com a resultat 99.6 %. La quantitat del producte és de 100 mg.

En la taula 5 s'adjunten les característiques de la Iprodiona en el qual es treballarà en el laboratori:

**Taula 5.- Característiques físico-químiques de la Iprodiona [20].**

<b>Dades d'identificació de la Iprodiona</b>	
Nom químic (IUPAC)	3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioxoimidazolidina-1-carboxamida
Estructura química	
Número de CAS	36734-19-7
Formula molecular	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
Sinònims	3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metiletil)-2,4-dioxo-1-imidazolidincarboxamida; Àcid 3-(3,5-diclorofenil)hidantoin-1-carboxílic isopropilamida; 3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metiletil)-2,4-dioxo-1-imidazolidincarboxamida; 1-isopropil carbamoil-3-(3,5-diclorofenil)-hidantoína; Anfor; Chipco 26019; Glycophen; Glycophene; Kidan; Promidione; Rop 500F; Rovral; Verisan
Aparença	Pólvora blanca
Tipus de plaguicida	Fungicida
Massa molecular	330,17
Punt de fusió	136 °C
Punt d'ebullició	164,5 °C
Solubilitat en aigua	13,9 mg/L a 25 °C
Soluble en	etanol, metanol, acetona, diclorometà, dimetilformamida, acetofenona, acetonitril, toluè i benzè
Principals riscos	Frases R: R40, R50/53 Frases S: S35, S36/37

Font .- INECC.

En els principals riscos es troben les frases R i frases S on:

- R40: Possibles efectes carcinògens.
- R50/53: Molt tòxic per als organismes aquàtics. Pot produir efectes perjudicials en el medi aquàtic a llarg termini.
- S35: Elimineu els residus del producte i els seus recipients amb totes les precaucions possibles.
- S36/37: Feu servir roba de protecció adequada. Feu servir guants adequats.

Tenint en compte aquestes frases principals de risc s'ha dut a terme les següents precaucions en el procediment de treball al laboratori:

- La roba de treball és un requisit molt important per a l'empresa, així doncs en la jornada laboral es imprescindible dur la samarreta, pantalons, sabates de seguretat, bata i armilla (en cas necessari, quan es baixa a fabriques).
- S'han utilitzat guants adequats al treballar amb tots els productes químics.
- La campana de gasos s'ha utilitzat per fer el procediment pràctic de preparació de la mostra i patrons.
- Tots els residus s'han guardat en un contenidor del laboratori especial per aquests. S'utilitza la normativa ADR: Acord Europeu Relatiu. Aquesta normativa regula el moviment de residus perillosos i estableix una sèrie de codis ONU, i etiquetatge, en base de la perillositat del residu.
- 

## 4.2. Aparells

Els aparells amb els que es va treballar al laboratori són: el cromatògraf de gasos "7890 Series GC System", el detector de masses "5973 Network Mass Selective Detector" i l'injector "7683 Series Injector". Tots els equips són de la marca Agilent. (**Figura 3**)



**Figura 3.- Aparell de cromatografia de gasos acoblat a espectrometria de masses.**

## 4.3. Mètodes analítics

### 4.3.1. Extracció de la mostra mitjançant el kit de QuEChERS

QuEChERS és l'abreviació en anglès Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (ràpid, fàcil, econòmic, efectiu, robust i segur).

Aquesta tècnica resol les deficiències dels mètodes tradicionals de preparació de la mostra com els procediments llargs d'extracció, l'ús de solvents perillosos, simplificant radicalment les anàlisis de residus múltiples de pesticides en mostres d'aliments.

Els avantatges més importants d'utilitzar aquesta tècnica són l'increment de la velocitat del tractament, la reducció significativa dels costos de materials i que els productes estan preparats en productes ultra-purs i pre-pesats.

La tècnica QuEChERS[21] consta de dos passos:

- Extracció dels pesticides i analits d'interès de les mostres d'aliments. Aquest procés es basa en la combinació del solvent orgànic amb diverses sals per passar els analits de les mostres d'aliments a la fase orgànica. Típicament s'utilitza acetonitril.
- Extracció en fase sòlida dispersiva SPE dispersiu (dSPE): per netejar l'extracte de possibles interferències com poden ser els lípids i pigments.

#### a) Material i reactius

- Liquadora
- Balança
- Tubs centrífuga 50 mL (kit QuEChERS KS0-8911)
- Sals (kit QuEChERS KS0-8911); són uns sobres
- Tub roQTM dSPE 2 mL (kit QuEChERS KS0-9511)
- Acetonitril
- Vòrtex
- Centrífuga gran per a tubs de 50 mL i petita per a tubs de 2 mL
- Micropipeta
- Vials
- Cromatògraf Agilent 6890 Series GC System

## b) Selecció del kit

Hi ha diferents kits per a QuEChERS, per tant, és important seleccionar el kit que sigui més adient i efectiu per a les mostres de fruita.

El mètode i kit utilitzat són els següents: mètode AOAC (Associació de Químics Analítics Oficial) 2007.01, kit d'extracció KS0-8911 i kit dSPE KS-9511.

El kit seleccionat conté:

- KS0-8911: 6 g  $\text{MgSO}_4$  i 1,5 g NaAOc. El sulfat de magnesi elimina l'excés d'aigua de la mostra. S'afavoreix la separació de fase entre l'aigua de la mostra i el d'acetonitril. L'acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) s'utilitza com a solvent d'extracció. L'acetat de sodi estabilitza el pH, ja que d'aquesta manera s'evita la degradació del pesticida i/o millora l'anàlisi per GC/MS. S'afegeixen les sals per millorar l'eficiència de l'extracció i protegir compostos sensibles.
- KS0-9511: 150 mg  $\text{MgSO}_4$  i 50 mg PSA. Serveix per facilitar l'extracció de l'anàlisi i elimina l'excés d'aigua i contaminants no desitjats de la mostra extreta.

## c) Procediment experimental. Extracció de la mostra

- Homogeneïtzar la mostra amb la quantitat d'aigua necessària (**Taula 6**) i pesar 15 g de la barreja de la mostra en un tub de centrifuga.

**Taula 6.- Relació d'aigua necessària per la mostra [22].**

Matriz	Cantidad Muestra	Dilución
Aceite	1,5 mL	1,5 mL $\text{C}_6$ (*)
Cereales	5 g	10g $\text{H}_2\text{O}$
Espicias	2 g	10g $\text{H}_2\text{O}$
Frutas, Vegetales 25-80% Agua	10 g	csp 10g $\text{H}_2\text{O}$ (**)
Frutas, Vegetales >80% Agua	10 g	no
Frutos Secos	5 g	7,5g $\text{H}_2\text{O}$
Naranja, limón	15 g	no(***)
Miel	5 g	10g $\text{H}_2\text{O}$

(\*) Procedimiento especial con CL2680  
 (\*\*) La cantidad de  $\text{H}_2\text{O}$  a añadir depende del contenido original. El contenido en agua del homogeneizado ha de ser de 80% aprox.  
 (\*\*\*) En extractos muy ácidos puede ser conveniente ajustar el pH con la adición de NaOH diluido al extracto final.

**Font.-** CromLab, 2014.

- Afegir-hi 1 mL d'acetonitril per cada 1 g de mostra. I afegir-hi a continuació 6 g  $\text{MgSO}_4$  i 1,5 g NaAOc, agitar en un vòrtex durant 60 segons i centrifugar durant 5 min a 4000 rpm.

## d) Procediment experimental. Neteja dSPE.

Afegir 1 o 8 mL del sobrenedant obtingut dins d'un tub roQ™ dSPE (els porta el kit), de 2 mL o 15 mL, respectivament. Agitar el tub d-SPE durant 30 segons i centrifugar durant 5 min a 4000 rpm.

Es transfereix el sobrenedant a un vial i es procedeix a analitzar-ho en el cromatògraf de gasos/EM.

#### 4.3.2. Elecció del mètode utilitzat per analitzar la Iprodiona

Per poder fer l'anàlisi de pesticides, en concret de la Iprodiona, es va buscar un mètode de treball amb un GC-MS (6890-5973).

El mètode utilitzat forma part de l'article publicat per la "Universidad Nacional de Colombia". Amb el títol de <<Método cualitativo rápido (screening) para la detección de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas,2018>>[23].

##### a) Instrumentació i equips

Per a l'anàlisi del mètode screening es va treballar amb un cromatògraf de gasos Agilent Technologies Model 6890A acoblat a un detector selectiu de masses 5973N, utilitzant una columna capil·lar ZB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm d'espessor).

En el procés d'extracció s'utilitza un homogeneïtzador. Com per el procés de neteja en aquest cas no es disposa del cromatògraf de gel permeació, aquesta neteja es farà amb el segon pas d'extracció de la mostra amb la neteja d-SPE del mètode QuEChERS.

##### b) Anàlisi quantitatiu

Les condicions d'operació es troben especificades en la següent taula (**Taula 7**):

**Taula 7.- Paràmetres cromatogràfics del cromatògraf de gasos-espectre de masses.**

	Paràmetre	Valor
<b>Injector columna</b>	Volum d'injecció	4 µL
	Injecció en modalitat	splitless
	Pressió de pols	65 psi durant 0,8 min
	Temps de purga	0,8 min
	Temperatura del injector	250 °C
	Gas de transport (pressió constant), He.	19 psi
<b>Forn</b>	Temperatura de la línia de transferència a l'espectròmetre de masses	280 °C
	Temperatura del quàdruple	150 °C
	Temperatura inicial	50 °C a 5 min
	Increment velocitat	20 °C/min fins arribar 195 °C
	Manteniment temperatura	5 min
	Increment temperatura	280 °C a 10 °C/min
	Manteniment temperatura	7,5 min
<b>Detector</b>	Mode ionització per impacte electrònic	70 eV
	Temperatura font ionització	230 °C
	Monitorig	ió selectiu (SIM)
	Selecció de ions realitzada injectant una solució amb els compostos d'interès	500 µg/mL
	Mode d'adquisició	Full Scan

El programa de temperatura del forn es va iniciar a 50°C (5 min), a continuació, augmentant la temperatura a una velocitat de 20 °C/min fins arribar a 195 °C i es va mantenir la temperatura durant 5 min i finalment s'incrementa la temperatura fins 280° C a 10° C/min i es manté durant 7,5 min. La temperatura del quàdruple és de 150° C. (**Taula 8**)

**Taula 8.- Rampa de temperatures del forn utilitzada per dur a terme la separació.**

Rampa del forn	Velocitat (°C/min)	Pròxims (°C)	Augment (min)	Temps d'execució (min)
Inicial	0	50	0	0
Rampa1	0	50	5	5
Rampa 2	20	195	5	17,25
Rampa 3	10	280	7,5	33,25

### c) Preparació de la mostra

Les mostres que es van utilitzar per fer les proves eren mostres enviades a laboratoris externs d'on es sabien prèviament els resultats. D'aquestes, finalment, es va seleccionar un suc de taronja on una mostra havia donat positiu amb 0,016 ppm de lprodiona i una altra que havia donat negatiu amb contingut  $< 0,01$  ppm.

Per a realitzar l'anàlisi es preparen dos kg de taronja i s'homogeneïtzen durant 5 min; posteriorment, porcions de mostra homogeneïtzada de 100 g s'emmagatzemen en bosses hermètiques a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a l'anàlisi.

El mètode utilitzat correspon a una modificació del procés d'extracció QuEChERS (explicat en el punt 4.3.1).

Una vegada tenim l'extracte de la mostra transferit al vial, s'introdueix al cromatògraf de gasos acoblat a espectrometria de masses.

### d) Protocol de validació qualitativa

La validació del mètode screening es va basar principalment en el document SANTE/EU 2015 i en la directiva de la comissió europea EU 657/2002. Els paràmetres de validació utilitzats corresponen a: selectivitat, límit de detecció del mètode screening (SLD) i aplicabilitat.

Per al compost d'interès es van fixar els següents paràmetres d'adquisició i monitoreig de ió selectiu (**Taula 9**).



**Taula 9.- Paràmetres d'adquisició i monitoreig selectiu.**

		Senyal m/z			
		ió objectiu	Ions de confirmació		
Compost	Tr	Q	q1	q2	q3
Iprodiona	23.959	314	316	187	189

m/z: massa/numero de carrega del ió

Tr: temps de retenció

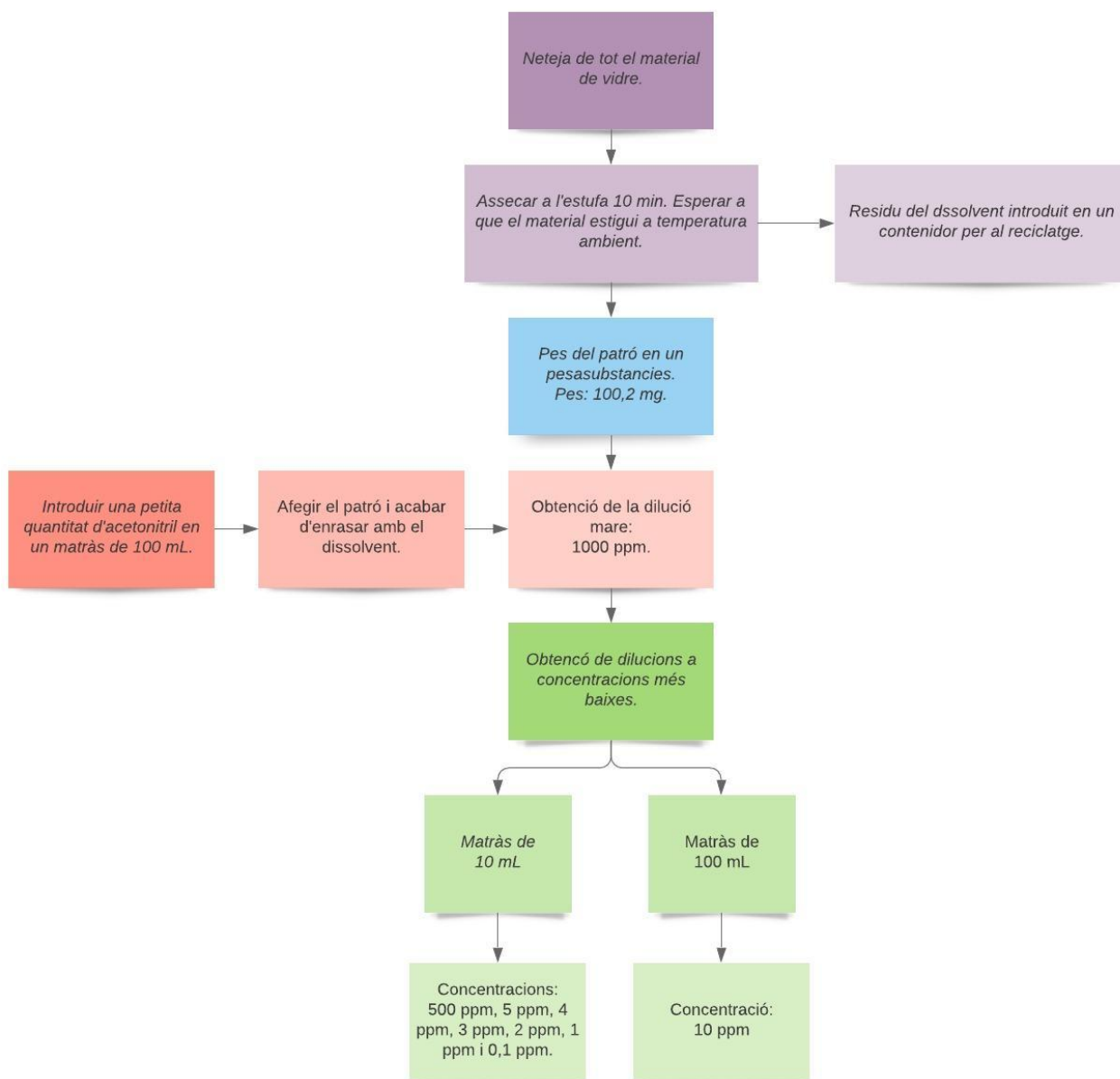
Q: quàdruple fa referència al ió objectiu

q: quàdruple fa referència als ions de confirmació.

#### 4.3.3. Procediment per a la preparació de la recta de calibració de la Iprodiona.

Per a dur a terme la validació es van preparar patrons de l'analit que cobrien l'interval adequat de concentracions per a la determinació de la mostra. Es fan diferents dissolucions de concentració coneguda i decreixen a partir d'una solució mare de 1000 mg/L de Iprodiona. (**Figura 4**)

Passos a seguir per preparar les dilucions:



**Figura 4.- Ordre de preparació de la solució mare i les dilucions.**

Inicialment, s'injecta en el cromatògraf dilucions entre 10-5 ppm. Veient que s'obtenen bons resultats del senyal a continuació, es prossegueix a preparar concentracions més baixes entre 5 i 0,1 ppm.

## 5. Resultats i discussió

M'agradaria explicar breument el context en què es va realitzar aquest treball, abans de passar a comentar els resultats obtinguts, perquè quedi més clara l'explicació.

En primer lloc aquest treball es va realitzar a conseqüència de la meva estada de pràctiques i com a persona que treballa en l'empresa a temps parcials. Amb la finalitat de perllongar les pràctiques i poder realitzar el TFG, l'empresa em va proposar la posta a punt del cromatògraf de gasos-espectre de masses del qual disposaven al laboratori per determinar Iprodiona. El repte em va semblar interessant ja que, a l'haver fet la titulació de sistemes biològics, i no haver fet anàlisi d'aliments directament, no m'havia format específicament amb la utilització d'un cromatògraf.

Amb la supervisió d'un tècnic de laboratori de l'empresa, vaig anar entenent el funcionament del cromatògraf i vaig aconseguir posar-lo a punt.

El procés a seguir per la posta a punt i validació, ha sigut en primer lloc, fer un manteniment de l'equip. Aquest equip era poc utilitzat i es volia veure si reunia les condicions per a poder ser utilitzat de forma rutinària per l'empresa. El següent punt ha sigut la calibració del patró Iprodiona per a concentracions de: 10, 5, 4, 3, 2, 1 i 0,1 ppm. Finalment es va dur a terme l'extracció de la Iprodiona en mostres de taronja prèviament analitzades en un laboratori extern i de les quals se sabien els resultats, mitjançant el kit de QuEChERS.

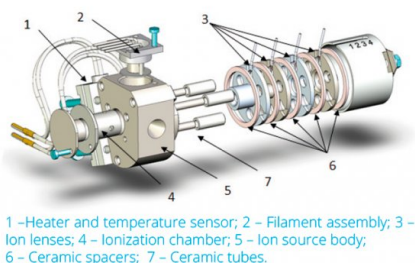
Una vegada obtingut els diferents patrons i la mostra d'assaig es va procedir a fer l'anàlisi mitjançant el cromatògraf gasos-masses d'on s'obtidran els resultats dels perfils cromatogràfics i espectres de masses per discutir-n'hi els resultats i poder veure si era viable l'ús del cromatògraf de manera rutinària en sucs de fruita.

Si els resultats de la calibració haguessin estat els adients, s'aplicarien a 3-4 mostres de fruites diferents.

## 5.1. Presa de contacte i manteniment de l'equip cromatogràfic Agilent 6890

En primer lloc, per dur a terme la validació del mètode es necessita fer un manteniment de l'equip per tal de garantir els bons resultats. Aquest manteniment s'ha fet conjuntament amb un tècnic de laboratori especialista en cromatografia.

1. Netejar la font de ions del detector de masses a partir del diagrama subministrat per l'empresa subministradora de l'aparell, per conèixer com desmuntar-ho. És important fer foto de com estan connectats els cables.



2. Canvi dels filaments que es troben dins de la font.



3. Netejar totes les peces de la font, a partir de la barreja d'aigua destil·lada amb òxid d'alumina. Es poleix la superfície metàl·lica amb un hisop.



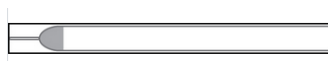
4. En un vas de precipitats de 500 mL, s'introduirà en l'ordre de més polaritat a menys polaritat els següents fluids:
  - a) Aigua destil·lada ( $\epsilon \approx 80,1$ )
  - b) Metanol ( $\epsilon \approx 32,7$ )

- c) Acetona ( $\epsilon \approx 20,7$ )
- d) Hexà ( $\epsilon \approx 2,0$ )

Per preparar aquesta mescla, primerament s'introdueix l'agua destil·lada i es posa 10 min al ultrasons. Es fa el mateix procediment després d'introduir el metanol, acetona i hexà.

Aquest procediment es duu a terme per fer la neteja de l'estructura de metall del detector, introduint totes les peces metàl·liques fins que quedin cobertes i deixar-ho reposar durant 1 hora.

5. Treure el sistema d'injecció, connectat en direcció al forn. Dins l'injector s'hi troba "Inlet liner". És un tub de 4 mm, en l'extrem d'aquest hi ha un cotó. Si aquest cotó es trobés al centre s'ha de canviar aquesta peça sencera.



6. Dins del forn a la part superior, treure l'aïllant que hi ha adjunt direcció al injector per canviar el Gold Seal.



7. Injecció Split-vent. Part injecta a la columna i part cap a l'exterior. És necessari filtre de carboni. El filtre de carboni serveix per absorbir bé la contaminació.
8. Trampa/Filtre. Caduca, cada x temps s'ha de canviar. Per aquest filtre passa el gas He cap al cromatògraf de gasos.



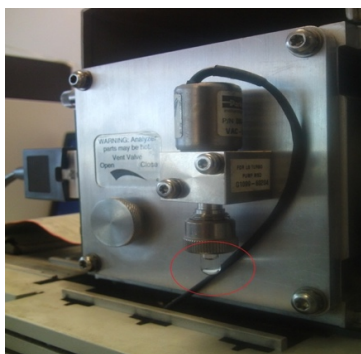
9. Canvi de columna. Important sempre que es faci un tall a la columna s'ha d'anotar en un registre per tal de fer un seguiment del manteniment d'aquesta. El tall es facilita amb una regla especial que té unes dentetes petites per poder fer el tall net. La columna es troba al forn i es connecta a l'injector i al masses:
  - 5 mm sobresurt cap a l'injector
  - 2-3 sobresurt cap al masses

La columna que s'ha utilitzat és Zebron ZB 5 com s'ha anomenat a l'apartat de l'elecció del mètode.

ZB-5 Phase Detail



10. Tornar a muntar de nou la font després de la neteja.
11. Evitar l'ús de materials que deixin partícules en la neteja del masses.
12. Tornar a col·locar la columna, sense forçar els nuts. En cas de que no faci bé el buit, enroscar una mica més el nut que va en direcció al masses.
13. Comprovar que la vent valve esta ben tancada.



14. Ordre per obrir l'instrument:

- Equip masses fins "100 % full" → Menu → + MS Parameters.
- GC → Power on successful.
- Obrir el programa del PC "GC MSD".

Nota: es fa una revisió de l'oli de la bomba, es canvia aproximadament cada 1 any.

## 5.2. Autoaprenentatge sobre el funcionament del cromatògraf de gasos, detector selectiu de masses i injector

### 5.2.1. Parts de l'equip cromatògraf i situació dins l'aparell

Split/Splitless Inlet Gold Seals: es troba connectat entre el forn i el injector. Forma un segell lliure de fuites amb la part inferior del cos d'entrada i la columna per minimitzar la contaminació de la mostra i la pèrdua d'aquesta. Petites filtracions al port d'injecció Split/Splitless poden reduir la sensibilitat del sistema, causar una mala reacció senyal-soroll, augmentar el sagnat de columnes i fins i tot reduir la vida de la columna.

Nut "Self tightening Column Nuts": es troba dins del forn subjectant la columna direcció al injector i al detector. Les connexions ajustades a les columnes redueixen el soroll de fons per obtenir resultats fiables. Instal·lar la femella i la rosca de la columna, mesurar la profunditat de la columna i ajustar-los a l'instrument fan que hi ha moltes maneres d'afegir variació als resultats. En aquesta peça hi ha un collaret que permet bloquejar la columna al seu lloc.

Fèrrula: 0,4 mm VG (85 % Vespel i 15% Graphite), es troba dins del nut, tant el que subjecta la columna que va en direcció cap al injector, com el que va en direcció al detector. Són rígids i reutilitzables i el grafit les autolubrica. Suporten una temperatura màxima de 400 °C i estan perforades amb precisió (no deixen residus).

Inlet Liner: es treu l'injector, en la part superior del forn (per fora) desenroscar el cargol, aquest es treu i dins es troba el liner i O-ring. S'agafa amb les pinces. Els revestiments d'entrada faciliten la vaporització de mostres a l'entrada del GC. Aquests impedeixen l'absorció i asseguren la transferència precisa de la mostra a la columna GC mitjançant una superfície desactivada robusta. Els revestiments de llana es conserven volàtils, allargant la vida de les columnes i disminuint la freqüència de manteniment de la font del MS.

Liner O-ring: aquesta peça es posa per fora del "liner" a la part superior per ajudar a fixar-se en la posició en que esta. S'utilitzen per formar un segell adequat al voltant de l'exterior del revestiment d'entrada del Inlett Liner. Estan compostos per material de grafit o fluorocarboni.

Septa: per marcar la columna, la distància que entra cap a l'injector o el detector. També es troba en la part superior del "Inlet liner" on es manté un segell lliure de fuites. Estan dissenyats específicament per funcionar a temperatures de fins a 400 °C.

Filament: es troba dins la font de ions del masses. Dins l'equip n'hi ha dos, quan es gasta un cal demanar a la màquina que utilitzi l'altre. Els electrons són produïts per emissió termoiónica. Aquests surten des de la superfície del filament i són accelerats cap a la càmera font de ions la qual es manté a un potencial positiu (igual al voltatge d'acceleració). Els electrons adquireixen una energia igual al voltatge entre el filament i la càmera font (típicament 70 electro-vols).

Tallador de columnes: té forma de regla, on pels costats està format per unes dentetes que tallen. És important fer els talls bé per evitar contaminacions o que per exemple, es quedi tapada la pròpia columna.

Avaluació, instal·lació i calibració estàndard del instrument GC; "GC Instrument Evaluation, Installation and Calibration Standards": és un kit on hi ha diferents productes per poder tenir l'aparell en bones condicions amb més certesa.

### 5.2.2. Tunne & Vacunn pel control dels paràmetres del cromatògraf-EM

Inicialment, abans d'introduir una mostra en l'aparell es realitza la prova de l'Autotune. Aquesta prova et permet determinar si els paràmetres del cromatògraf i del masses són correctes. Com que l'aparell no ha estat en bones condicions durant un temps, és important fer l'Autotune moltes vegades fins que s'estableixin els paràmetres inicials desitjats. Després es pot fer una vegada per setmana en cas que estigui en marxa l'aparell.

A partir de la primera finestra que surt del programa instrument control, entrar en view; Tune and Vacuun control. Es modifiquen els paràmetres manualment de l'aigua i el nitrogen, introduint els pesos moleculars; 18 g/mol i 28 g/mol respectivament.

Entrar l'apartat del Tune MSD on sortirà l'informe del Autotune imprès amb els paràmetres. Els més importants que s'han d'observar són els percentatges de H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> i N<sub>2</sub>; aquests han de ser menors o iguals als límits; H<sub>2</sub>O ≤ 20 % ; O<sub>2</sub> ≤ 2,5 %; N<sub>2</sub> ≤ 10 %. També observar el EMVolts (multiplicador

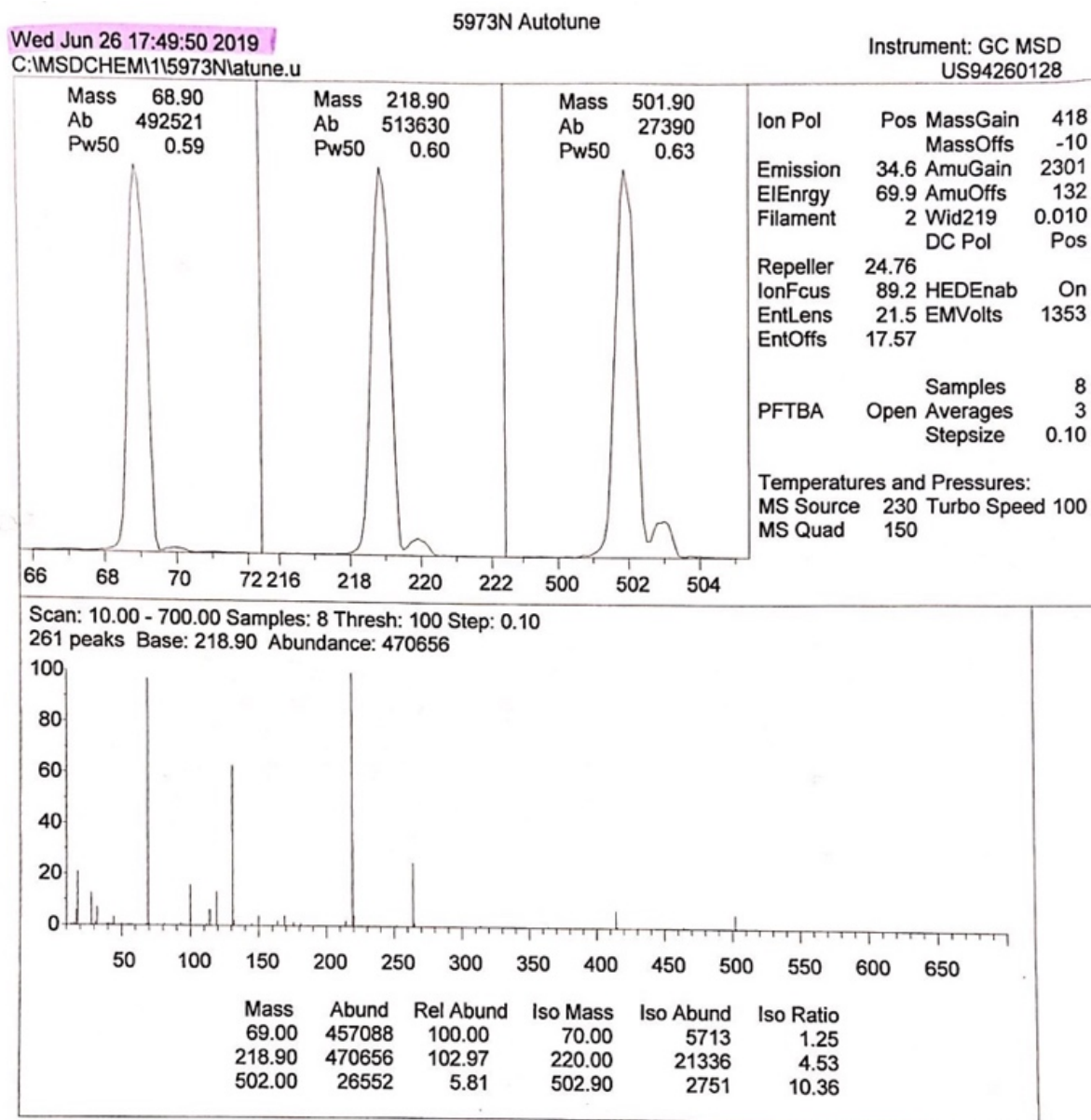


d'electrons de voltatge en el detector), aquest quan és nou es troba entre un valor de 800-900 i no ha de sobrepassar de 1800-2000, ja que si no indica un problema de sensibilitat.

Entrar a Tune Evaluation, en aquest cas ens imprimirà tots els paràmetres on es mostrarà la verificació del sistema on tot han d'estar tots en "OK".

Per tant s'imprimiran dos fitxes, la de Autotune (**Figura 5**) i la del sistema de verificació (**Figura 6**).

Aquest és el resultat obtingut:



Air/Water Check: H2O~21.66% N2~13.00% O2~7.43% CO2~3.61% N2/H2O~60.01%

Column(1) Flow: 1.3 Column(2): 0 ml/min. Interface Temp: 280

Ramp Criteria:

Ion Focus Maximum 90 volts using ion 502; EM Gain 261023  
Repeller Maximum 35 volts using ion 219; Gain Factor 2.61

MassGain Values(Samples): 419(3) 420(2) 428(1) 454(0) 506(FS)

TARGET MASS: 50 69 131 219 414 502 800

Amu Offset: 132.0 132.0 132.0 132.0 132.0 132.0 132.0

Entrance Lens Offset: 17.6 17.6 17.6 17.6 17.6 17.6 17.6

Figura 5.- Informe dels resultats dels paràmetres de l'Autotune.

### System Verification - Tune (Detector Optimization) Portion

Instrument Name	: GC MSD	
DC Polarity	: Positive	
Filament	: 1	
BasePeak should be 69 or 219		OK
Position of mass 69	69.00	OK
Position of mass 219	219.00	OK
Position of mass 502	502.00	OK
Position of isotope mass 70	70.05	OK
Position of isotope mass 220	220.00	OK
Position of isotope mass 503	503.00	OK
Ratio of mass 70 to mass 69(0.5 - 1.6%)	1.14	OK
Ratio of mass 220 to mass 219(3.2 - 5.4%)	4.34	OK
Ratio of mass 503 to mass 502(7.9 - 12.3%)	10.00	OK
Ratio of 219 to 69 should be > 40% and is	84.19	OK
Ratio of 502 to 69 should be > 2.4% and is	5.45	OK
Mass 69 Precursor (<= 3%)	0.30	OK
Mass 219 Precursor (<= 6%)	0.61	OK
Mass 502 Precursor (<= 12%)	2.27	OK
Testing for a leak in the system		
Ratio of 18 to 69 (<20%)	2.74	OK
Ratio of 28 to 69 (<10%)	9.68	OK
Electron Multiplier Voltage	1071	OK

Tune portion of System Verification passed.

System Verification for GC MSD Wed Jul 10 17:37:39 2019 Page 1

Figura 6.- Informe dels resultats del Tune Evaluation.

En la figura 5 es mostra la calibració de l'espectre de masses utilitzant Perfluorobutilamida (PFTBA) que permet la calibració de l'equip per a un ampli interval de masses, essent els pics més intensos els corresponents a les masses 60, 219 i 502 m/z. Mitjançant la calibració Autotune, s'ajusten automàticament els paràmetres relatius a la calibració de masses, extracció, enfocament, acceleració i detecció dels ions, per a obtenir la major sensibilitat i una adequada resolució.

Els paràmetres més importants d'aquest document són "Air/Water Cheek" on el percentatge de l'aigua, l'oxigen i el nitrogen han de ser menors als límits establerts;  $H_2O \leq 20 \%$ ;  $O_2 \leq 2,5$  i  $N_2 \leq 10 \%$ . També el EMVolts (multiplicador d'electrons de voltatge en el detector) que no ha de sobrepassar el valor d'entre 1800 i 2000 Volts.

En la figura 6 es mostra l'avaluació del Tune on mostra si els paràmetres de la figura anterior estan correctes o no per poder prosseguir amb el funcionament i treball de l'equip.

### 5.2.3. Programació de l'ordinador per analitzar una mostra

En el programa GC MSD a la finestra principal "Instrument Control" hi ha dos opcions per guardar i posar les dades a l'ordinador; "Sequence" i "Method".

A l'apartat de "Sequence" es pot editar un Excel on hi surten diferents camps per omplir: el tipus de mostra, el numero de vial (posició), "sample" i "data file" on s'introdueix el mateix nom i a "method/keyword" s'introdueix el mètode escrit amb el mateix nom que està guardat.

- Data Path: Guardar a carpeta (Computer → Local Disk (C:) → nom arxiu o usuari → Dades).
- Method Path: Guardar a carpeta (Computer → Local Disk (C:) → nom de l'arxiu o usuari → Method\_2019).

A l'apartat de "Method" es poden carregar, un per un, tots els mètodes que es vulguin utilitzar.

- Load Method: Computer → nom arxiu o usuari → Method\_2019.

Per a crear un mètode nou, introduir/modificar els paràmetres desitjats i "Save Method As".

Finalment per a que es realitzi els mètodes i la seqüència que s'ha demanat "Run Sequence".

#### 5.2.4. Injecció de la mostra

Una vegada es van tenir els mètodes amb els paràmetres pertinents per cadascun d'ells i la seqüència en l'ordre que es volia analitzar, es van introduir les mostres a l'injector.

En l'injector hi ha diferents posicions:

- Espai A: Vial de neteja. Omplir el vial de Acetona.
- Espai B: Vial de neteja. Omplir el vial de Acetonitril.
- Espai WA: Vial de rebuig, aquest ha d'estar sense mostra.
- Espai de 1 a 8: Vuit espais per a vuit vials. S'hi posaran les mostres que preparem per analitzar.

Cada vegada que es fa una seqüència, és important posar un vial (el blanc), amb mostra d'acetonitril que és el dissolvent que s'ha utilitzat tant en patrons com en el procés d'extracció de les mostres en el mètode QuEChERS. Aquest vial servirà de neteja de la xeringa després de cada punxada de mostra a analitzar.

#### 5.2.5. Funcionament del programa "Data Analysis"

Hi ha dues opcions d'integrar la mostra que s'ha analitzat, automàticament o manualment.

Automàticament: el programa integra per defecte, els pics del cromatograma i els analitza.

Manualment: com que estem buscant un pic en concret de vegades es millor utilitzar aquesta opció:

- Integrar manualment → Tools → Options → Manual Integration.  
S'amplia el pic que volem integrar i es selecciona de quin punt a quin altre es vol que es calculi l'àrea. Per poder veure l'àrea, s'apunta el pic i des de la finestra de "Chromatogram" s'agafa l'opció de integració dels resultats.

### 5.3. Dificultats del procés operant amb els equips de treball i possibles solucions

- En el moment que es van posar en funcionament tots els equips i es deixa passar el mínim de dues hores per a que s'estabilitzi, el detector de masses es para.
  - **Motiu:** la màquina MSD deixa de fer el buit. S'escalfa la bomba i es para degut a que hi ha pèrdues d'oli.
- En la pantalla de l'equip de cromatografia de gasos apareix "flow shutdown".
  - **Motiu:** S'observa si el manòmetre del gas He està en correctes condicions de pressió. En el laboratori el manòmetre marca 1,2 bar d'He però, a baix del laboratori on hi ha la bombona marca 0 bar.
- Quan es fa el procediment d'avaluació de paràmetres, l'Autotune, tant el N<sub>2</sub> com el O<sub>2</sub> dona un percentatge molt alt. En la pantalla de l'equip del cromatògraf hi surt "Front inlet purging".
  - **Motiu:** Al quedar-se sense He, és possible que hagi entrat aire i s'hagi desestabilitzat el sistema. Un possible procés per recuperar els paràmetres en condicions normals de N<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> seria modificar aquesta opció:



Instrument:

- Columns → Flow → Pujar a 2,5.
- Oven → Setpoint °C → Pujar a 120°C (pot augmentar fins 200 °C)

Aquests valors s'introdueixen en el sistema per tal de que vagi més ràpid a establir-se els paràmetres i després d'establir-se es continua fent Autotune per veure de quina manera varien els valors.

En el programa de "Edit Tune Parameters" s'ha de posar "scan" i "stop", no deixar només amb el procés de "scan" perquè si no, no s'optimitza.

També per obtenir millor resultat, es pot forçar una mica el Nut. D'aquesta manera es pot observar si és en aquest punt on es produeix una petita fuga.

- El problema del N<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> continua vigent. Els valors d'aquests paràmetres no corresponen als que haurien de sortir. Ambdós paràmetres donen uns resultats de 14-15 %. En cap moment han disminuït per molt que s'ajustessin una mica els Nuts i es fes un bon tall de la columna.
  - Motiu: Probablement el filtre que hi havia en el cromatògraf es va saturar. Les diferents opcions que es podien dur a terme van ser les següents:
    - Purgar la línia del gas He al fer el canvi de bombona.
    - Canvi del filtre de gasos portador i assegurar que no hi hagi fugues en les connexions.

Resultats actuals (≈); N<sub>2</sub> 15 ; O<sub>2</sub> 14.

Resultats que haurien de sortir N<sub>2</sub> ≤ 10 i O<sub>2</sub> ≤ 2,5. (Proporció 4:1 ; 80%:20%).

Es va trobar una fuga en la vàlvula de la bombona d'He. Com que no disposava d'espri antifuites, es va posar aigua amb sabó a les parets del tub de la bombona on es cregui que hi hagi possibles fugues. Si existeix alguna fuga, s'inflama la bombolla de sabó.

Tots els llocs que hi podia haver possibles fugues, es donaven per revisats i tot i així el N<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> continuava donant els mateixos resultats. La única solució era fer el canvi de trampa/filtre.

Funcionament trampa/filtre: El gas He és conduït cap a la trampa/filtre. Aquest absorbeix el gas i l'allibera de possibles contaminants, el que fa és purificar l'He. L'Heli és un element químic de baix pes molecular, això repercuteix a l'hora de guanyar-se l'espai per només ser ell el protagonista. En l'aire es troba un 20% de O<sub>2</sub> i un 80 % de N<sub>2</sub>, aquest contamina la mostra i com ambdós molècules pesen més que el He el perjudiquen dificultant el pas.

## 5.4. Calibració del patró d'Iprodiona

Per fer l'explicació d'aquesta part s'utilitzarà els resultats de les mostres patró de 10, 5, 4, 3, 2 i 1 ppm com a exemples.

La informació que ens dona el cromatògraf esta recollida en la figura 7.

### 5.4.1. Informació del document imprès

En el document imprès hi surten tres pàgines. En la primera pàgina ens surt la data, operador, instrument de mesura, mostra i el vial.

A continuació es mostren tres gràfics. El primer i el segon són perfils cromatogràfics de la mostra on, en l'eix d'ordenades hi ha l'abundància i en l'eix d'abscisses hi ha el temps de retenció.

El segon gràfic és una ampliació del primer perfil. En aquests dos gràfics s'hi presenta una línia que forma un conjunt de pics més o menys a baixa abundància i un destacat a alta abundància que representa l'analit d'interès. (Figura 7 a)

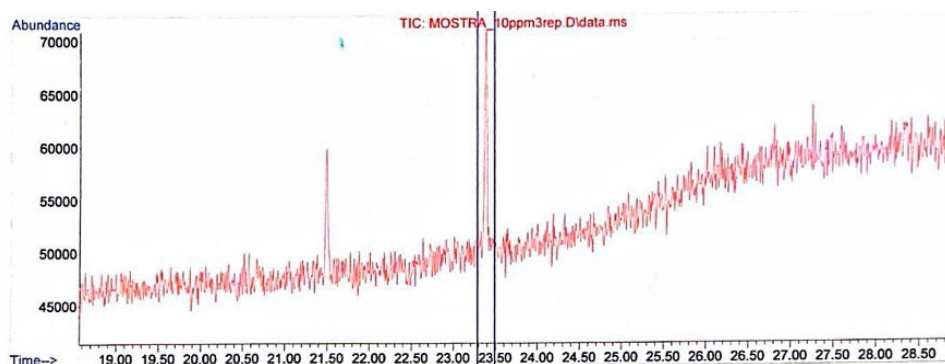


Figura 7.-a/ perfil cromatogràfic del patró 10 ppm Iprodiona.



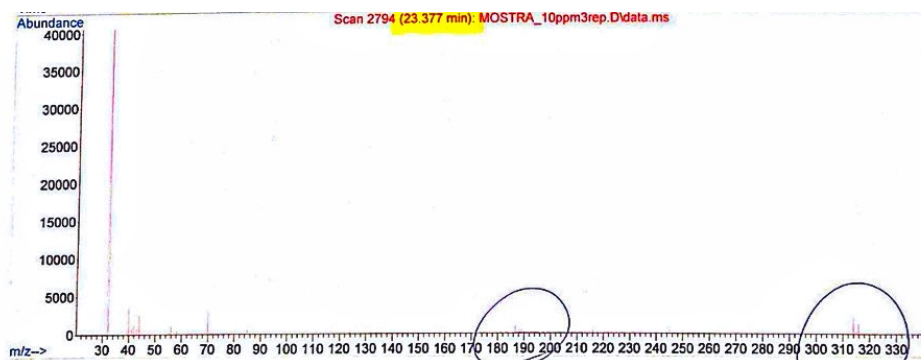


Figura 7.- b/ espectre de masses del patró de 10 ppm Iprodiona.

En el tercer gràfic (**Figura 7 b**) s'observa l'espectre de masses on, en l'eix d'ordenades hi ha l'abundància i en l'eix d'abscisses hi ha el senyal  $m/z$ . També s'hi observen diferents pics independents en diferents punts del senyal.

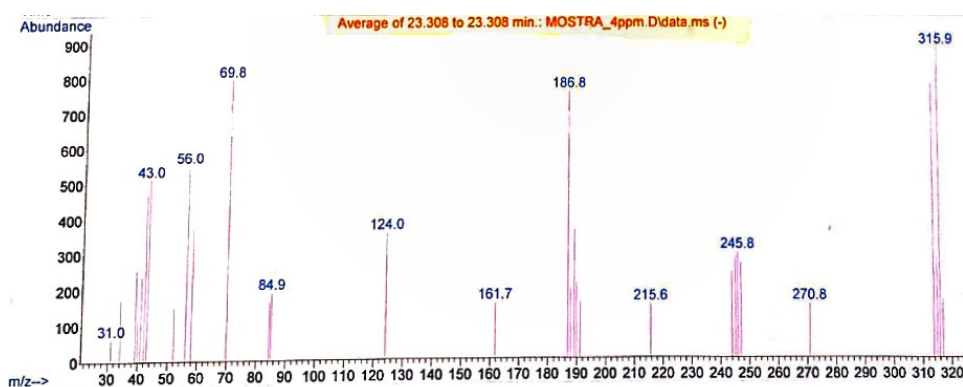
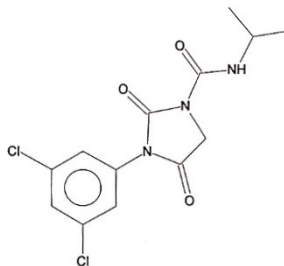
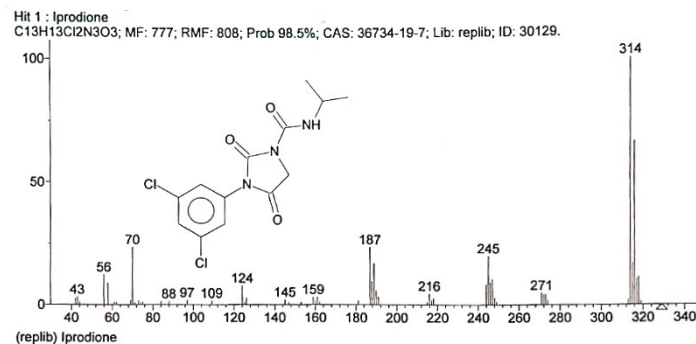


Figura 8. Espectre de masses de la mostra patró de 4 ppm.

En la tercera gràfica també hi ha la possibilitat que el senyal  $m/z$  es vegi millor. La manera de fer-ho és restant una porció molt petita de l'àrea el pic del patró Iprodiona, amb una porció de l'espai fora i just al costat de l'àrea del patró. D'aquesta manera, tal com es mostra en la figura 8 es visualitza millor el senyal  $m/z$  i es detecta el ió objectiu;  $Q$  a 314  $m/z$  i els ions de confirmació;  $q_1$  a 316,  $q_2$  a 187  $m/z$  i  $q_3$  a 189  $m/z$ .

En la segona i tercera pàgina es mostra la regió de l'àrea marcada on s'ha fet la integració per trobar l'analit Iprodiona. Ens facilita tota informació procedent d'aquest àrea. (**Figura 9**)



Name: Iprodione  
Formula: C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
MW: 329 Exact Mass: 329.033396 CAS#: 36734-19-7 NIST#: 320537 ID#: 30129 DB: replib  
Other DBs: RTECS, EINECS  
Contributor: NIST Mass Spectral Data Center  
Related CAS#: 61840-50-4  
10 largest peaks:  
314 999 | 316 663 | 70 236 | 187 235 | 245 199 | 315 172 | 189 169 | 56 123 | 318 114 | 317 109 |  
54 m/z Values and Intensities:  
42 26 | 43 31 | 44 14 | 56 123 | 58 89 | 61 11 | 62 11 | 69 20 | 70 236 | 71 10 |  
73 16 | 74 11 | 75 12 | 84 13 | 88 14 | 97 18 | 109 16 | 124 78 | 125 12 | 126 27 |  
145 21 | 147 12 | 153 11 | 159 32 | 160 19 | 161 32 | 162 14 | 181 17 | 187 235 | 188 97 |  
189 169 | 190 60 | 191 34 | 215 12 | 216 46 | 217 20 | 218 26 | 244 84 | 245 199 | 246 93 |  
247 105 | 248 29 | 249 13 | 271 50 | 272 44 | 273 45 | 274 19 | 313 21 | 314 999 | 315 172 |  
316 663 | 317 109 | 318 114 | 319 15 |  
Synonyms:

- 1.1-Imidazolidinecarboxamide, 3-(3,5-dichlorophenyl)-N-(1-methylethyl)-2,4-dioxo-
- 2.Chipco 26019
- 3.Glycophen
- 4.Glycophene
- 5.Iprodial
- 6.LFA 2043
- 7.Promidione
- 8.Rovral
- 9.Rovral Flo
- 10.RP 26019
- 11.3-(3,5-Dichlorophenyl)-N-(1-methylethyl)-2,4-dioxo-1-imidazolidinecarboxamide
- 12.FA 2071
- 13.1-Isopropyl carbamoyl-3-(3,5-dichlorophenyl)-hydantoin
- 14.MRC 910
- 15.NRC 910
- 16.ROP 500 F
- 17.3-(3,5-Dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxo-1-imidazolidinecarboxamide #
- 18.3-(3,5-Dichlorophenyl)-1-(1-methylethyl)carbamoylhydantoin
- 19.Kidan
- 20.Rovral 50WP
- 21.Rovral PM
- 22.Verisan

Figura 9.- a/ formula i b/ Sinònims Iprodiona.

#### 5.4.2. Comparació dels resultats dels patrons 10, 5, 4, 3, 2 i 1 ppm.

Per crear el conjunt de patrons de la Iprodiona es va fer a partir d'una concentració de 1000 mg/L.

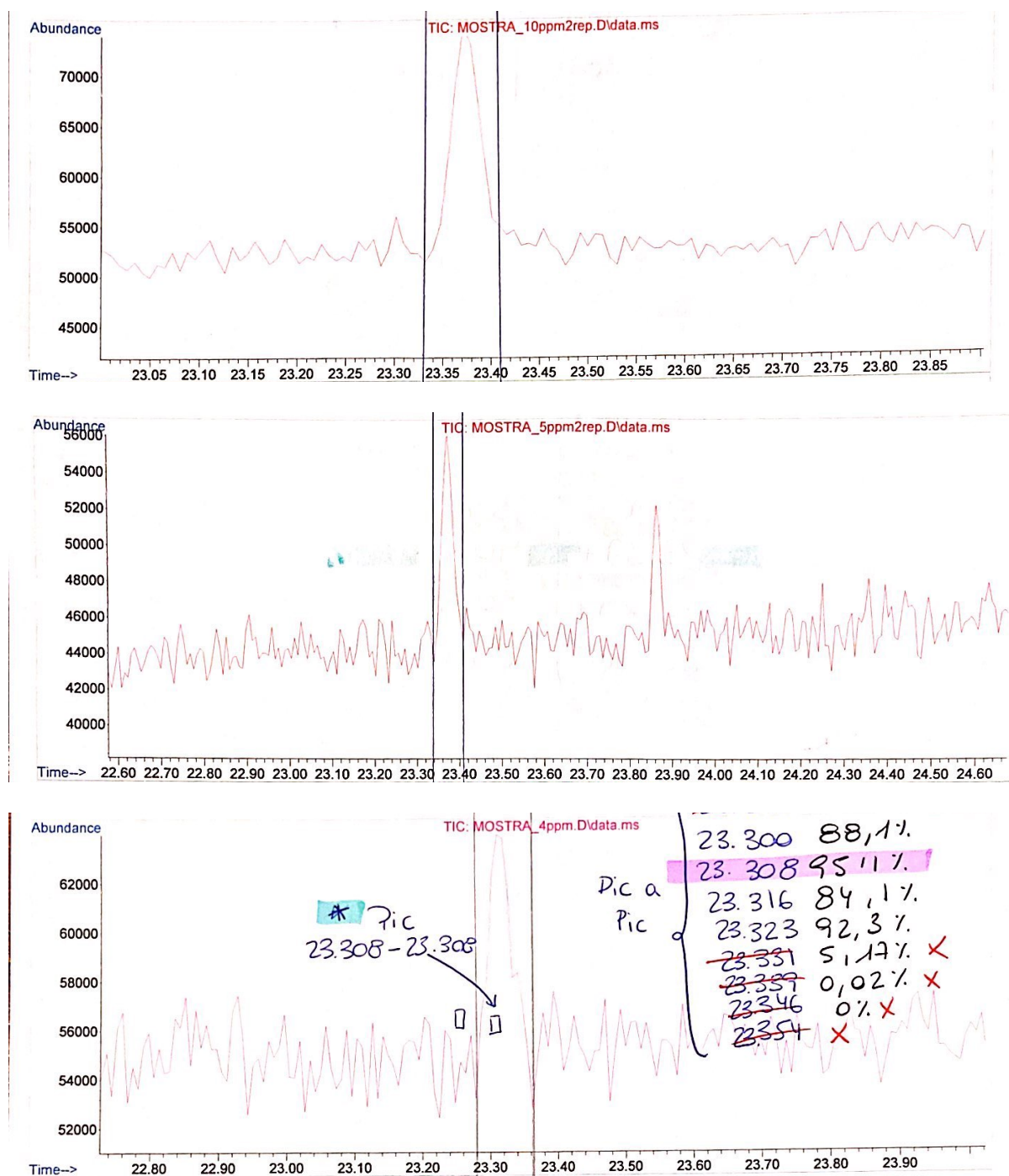
En el mètode de referència escollit, la Iprodiona té un temps de retenció de 23,959 min. Després d'integrar i analitzar diferents àrees de la mostra patró, on es determina un percentatge més alt de contingut de Iprodiona, s'ha pogut observar en el gràfic de l'espectre de masses diferents temps de retenció. Aquests es troben entre el rang de 23,300 min i 23,385 min.

La confirmació de que en aquest minut hi hagi aquesta probabilitat tant alta, es va comparar amb els minuts anteriors i posteriors tal i com es mostra en la taula 10.

**Taula 10.- Resultats de probabilitat de Iprodiona en diferents àrees de tots els patrons analitzats.**

Patró	Temps de retenció (min)	Probabilitat Iprodiona (%)
10 ppm	23,369	96,4
	23,377	97,5
	23,385	97,1
5 ppm	23,362	89,2
	23,369	96,8
	23,377	90,4
4 ppm	23,3	88,1
	23,308	97
	23,328	84,1
3 ppm	23,301	58,9
	23,308	96,4
	23,316	75,5
2 ppm	23,369	No resultat
	23,377	
	23,385	
1 ppm	23,369	5,97
	23,377	5,97
	23,385	-

Tot seguit es mostra la comparativa entre els diferents gràfics dels perfils cromatogràfics (**Figura 10 i 11**) i els dels espectres de masses. (**Figura 12 i 13**)



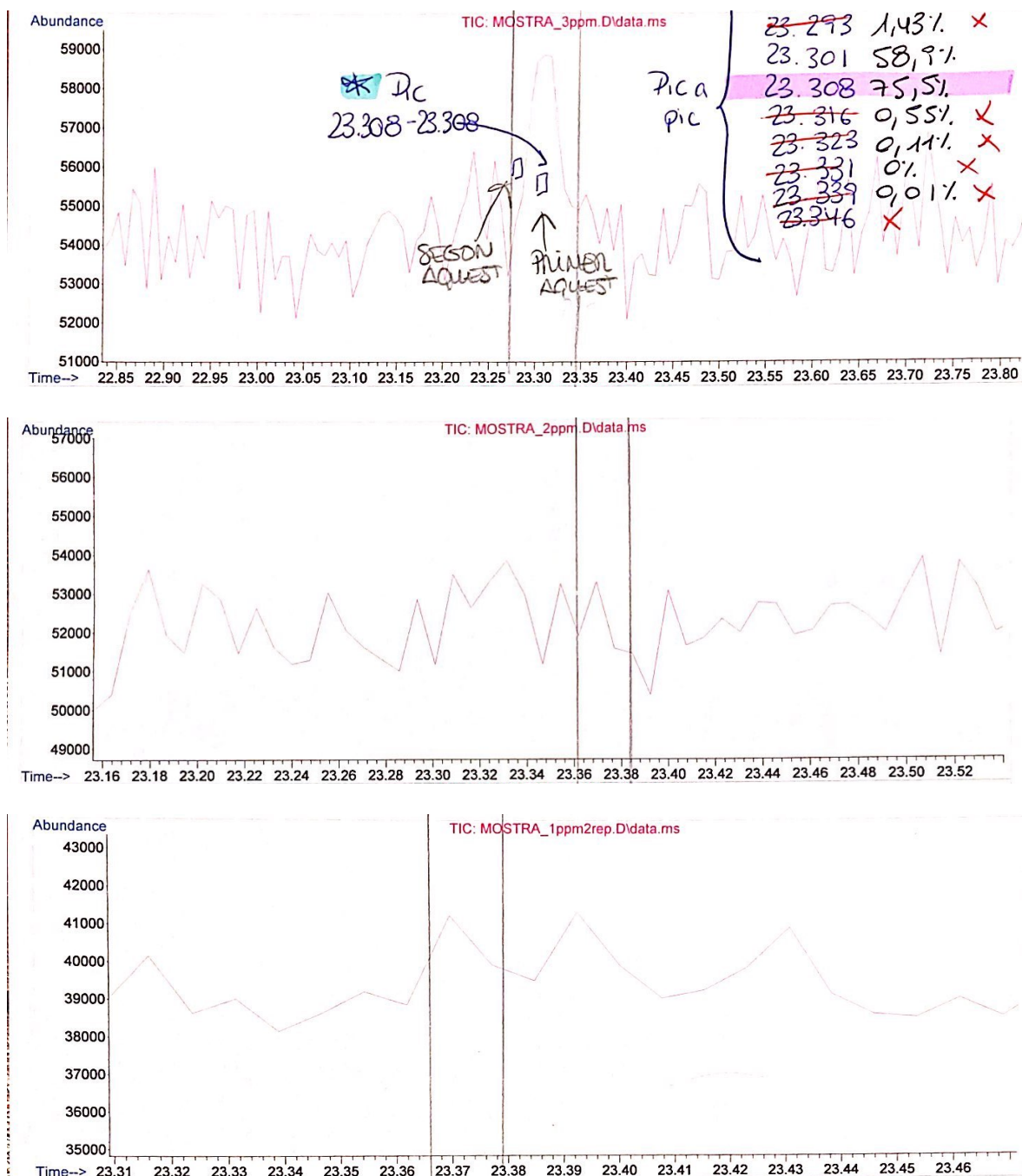


Figura 11.- Perfil cromatogràfic dels patrons de d/ 3 ppm, e/ 2 ppm i f/ 1 ppm.

En les figures 10 i 11 per a les diferents concentracions de patró es representa l'abundància isotòpica respecte el senyal. En el patró 4 i 3 ppm la intensitat del pic bàsic de la lprodiona encara es detecta però a partir del patró 2 ppm ja no es detecta senyal de la lprodiona.



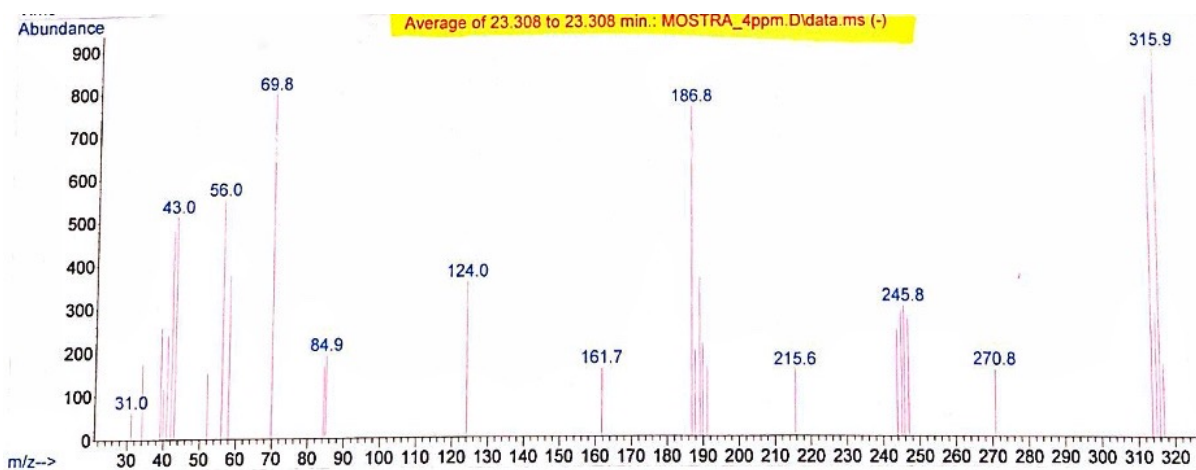
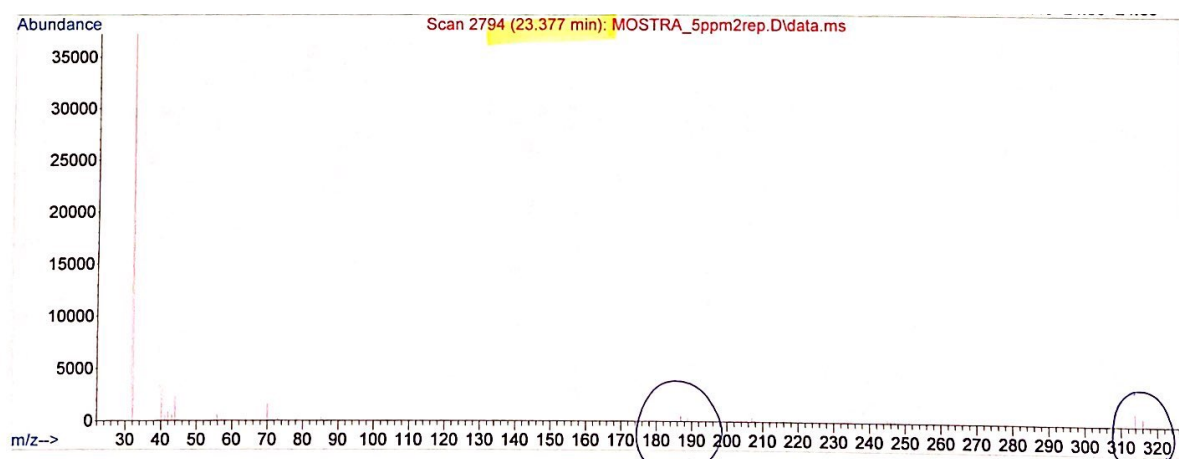
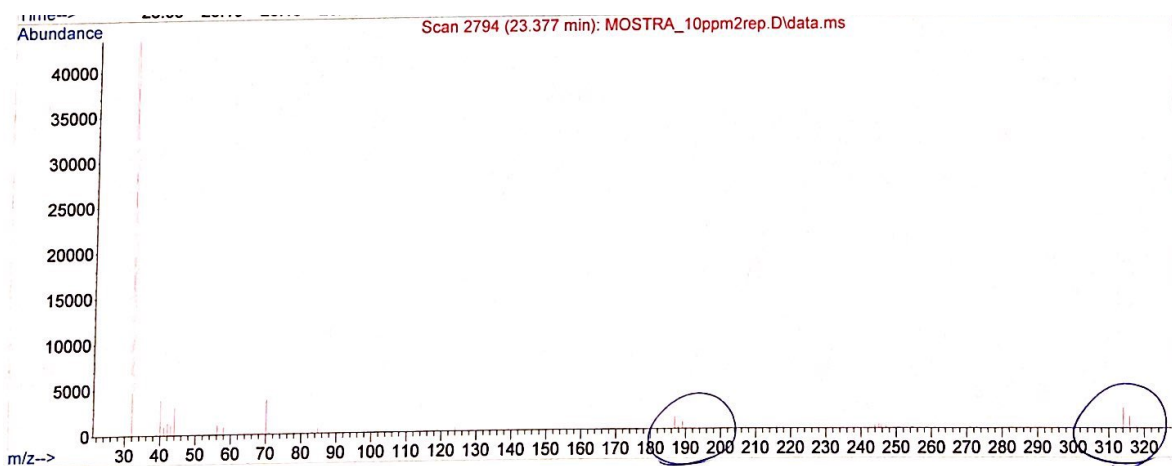
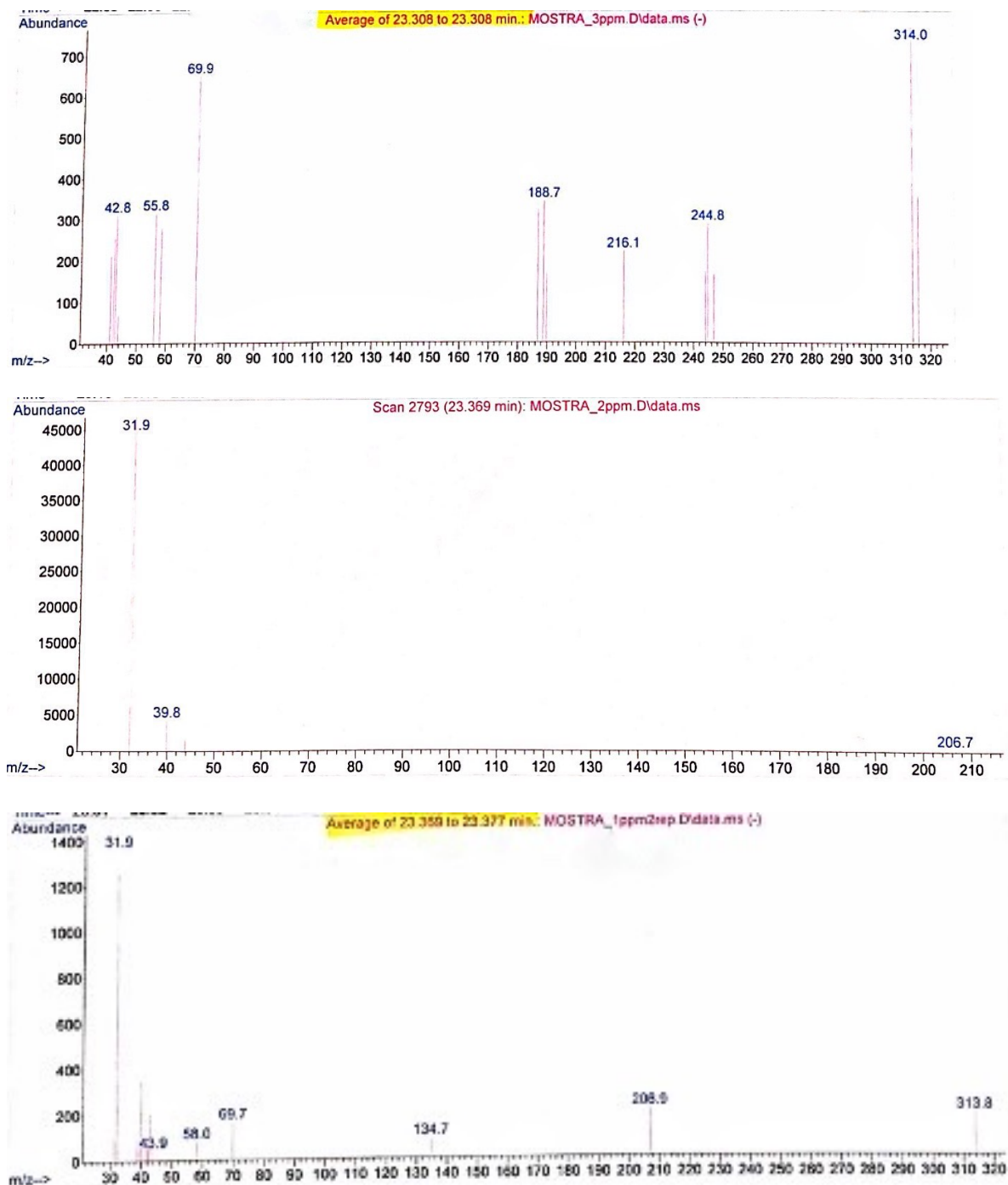


Figura 12.- Espectre de masses dels patrons de a/ 10 ppm, b/ 5 ppm, c/ 4 ppm.



**Figura 13.- Espectre de masses dels patrons de d/ 3 ppm, e/ 2 ppm i f/ 1 ppm.**

En els espectres de les figures 12 i 13, es pot observar en major o menor mesura les senyals elèctriques dels quàdruples. Algunes de les senyals que es veuen pertanyen a l'ió objectiu 314 m/z i als ions de confirmació 316, 187 i 189 m/z. En el patró de 10 i 5 ppm s'haurien de veure reflectits l'ió objectiu i de confirmació, i es poden arribar a veure, igual que en l'espectre del patró 4 i 3 ppm, però al principi mancava l'aprenentatge amb el programa.

Més endavant en analitzar els patrons de 4 i 3 ppm si vaig poder visualitzar millor l'espectre i crear una perspectiva que hem permetés identificar millor els ions dels quàdruples. La confirmació de què en els patrons 10 i 5 ppm s'haurien d'haver introduït un altre espectre més informatiu es pot verificar veient la taula 10 on s'observen les probabilitats en percentatge d'aparició de la Iprodiona, i per tant els ions corresponents d'identificació.

En els espectres dels patrons 2 i 1 ppm la senyal disminueix o gairebé és absent, no podent detectar els patrons.

## 5.5. Assajos d'extracció amb mostres de fruites

Es van realitzar 3 repeticions per a l'extracció de la mostra de taronja per obtenir l'extracte final a mesurar. En ambdós casos, tant per a la mostra que donava positiu com per la mostra que donava negatiu, es va agafar el mateix pes de mostra essent aquest de 15 g, independentment del contingut esperat de Iprodiona realitzats pels laboratoris de referència.

El Kit QuEChERS proposat sembla adequat per fer l'extracció i neteja, encara que no s'ha pogut comprovar ja que, els rangs de Iprodiona en les mostres estaven per sota dels límits que es podien quantificar en el cromatògraf que s'ha posat a punt.

En aquest apartat no s'ha pogut aportar cap perfil cromatogràfic ni espectre dels resultats de la mostra que es va extreure de taronja. Per comprovar que aquest mètode d'extracció ha estat correcte caldria fer la mesura de l'extracte de la mostra en un cromatògraf que pugues detectar quantitats tan petites com les que es desitja. Una altra forma de veure si acabava de funcionar el mètode hagués estat addicionar a la mostra una quantitat de Iprodiona coneguda (patró) i veure la seva recuperació, però això no va ser possible a causa de la finalització del període estival de pràctiques.



## 6. Conclusions

Posta a punt de l'equip: l'equip cromatogràfic assajat està en bon estat per obtenir uns paràmetres de treball més o menys adequats per poder realitzar les anàlisis, encara que el  $N_2$  i el  $O_2$ , els únics paràmetres, obtinguts a partir de l'Autotune que difereixen dels valors idonis, però això no ha impedit la continuïtat del treball.

Mètode d'extracció: el Kit QuEChERS tant per l'extracció de la mostra com per la neteja va ser adequat i no es va tenir cap problema durant el procediment.

A nivell d'identificació: els perfils cromatogràfics del patró de Iprodiona ens donen un temps de retenció entre 23,300 min i 23,385 min mostrant un pic diferenciat i amb molta abundància de l'anàlit, més o menys sobre els 70000 d'abundància isotòpica.

En l'espectre de masses, el senyal de la Iprodiona es situa en l'eix d'abscisses entre un rang de 0 a 320 m/z. En aquests perfils es representa l'ió objectiu Q a 314 m/z i els ions de confirmació  $q_1$  a 316,  $q_2$  a 187 m/z i  $q_3$  a 189 m/z, on s'ha pogut comprovar i verificar que es troba el patró Iprodiona.

A nivell de quantificació: el patró de 4 ppm permet observar els diferents ions; objectiu i de confirmació. I obtenir el seu perfil cromatogràfic però a mesura que disminueix la concentració es redueix la informació del senyal m/z, arribant a ser indetectable a concentracions de 2 i 1 ppm.

*La conclusió del projecte és que s'han pogut observar els patrons de 10 a 3 ppm, però a partir d'aquest últim valor a 0,01 ppm, no ha estat possible. De la mateixa manera que no ha sigut possible determinar la presència o absència d'una mostra d'assaig. El valor desitjat per l'anàlisi de Iprodiona està entre 0,1 i 0,01 ppm però en les condicions utilitzades d'aquest treball i a causa de l'estat del cromatògraf va estar impossible de detectar i/o quantificar. Possiblement si s'hagués utilitzat un detector FID (més selectiu) s'hauria pogut arribar a detectar quantitats lleugerament inferiors.*

## Bibliografia

- [1] EFSA, "Scientific topic: Plaguicidas | European Food Safety Authority." [Online]. Available: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/pesticides>. [Accés: 10-Feb-2020].
- [2] Generalitat de Catalunya, "Límit màxim de residus (LMR) de plaguicides. Agència Catalana de Seguretat Alimentària," *Agència Catalana de Seguretat Alimentària*. [Online]. Available: <http://acsa.gencat.cat/ca/detall/article/Limite-maximo-de-residuos-LMR-de-plaguicidas>. [Accés: 10-Feb-2020].
- [3] ONU, "Sistema de las Naciones Unidas," *Dep. Inf. Pública las Nac. Unidas*, p. 1, Jun. 2011. [Accés: 12-Feb-2020].
- [4] Burger Mr, "Los plaguicidas y sus impactos a la salud Introducción," *Revista SSQ N° 2*. [Online]. Available: [http://rapaluruquay.org/agrotoxicos/Uruguay/Los\\_plaguicidas\\_y\\_sus\\_impactos\\_a\\_la\\_salud.htm](http://rapaluruquay.org/agrotoxicos/Uruguay/Los_plaguicidas_y_sus_impactos_a_la_salud.htm). [Accés: 11-Feb-2020].
- [5] FAO, "Eliminación de Grandes Cantidades de Plaguicidas en Desuso en los Países en Desarrollo - Colección FAO: Eliminación de Plaguicidas - 4," 1996. [Online]. Available: <http://www.fao.org/3/W1604S/w1604s00.htm#Contents>. [Accés: 11-Feb-2020].
- [6] Lim S., "WHO | Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)," *WHO*, 2020. [Accés: 12-Feb-2020].
- [7] CCPR, "Committee detail ES | CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO." [Online]. Available: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee-detail/es/?committee=CCPR>. [Accés: 12-Feb-2020].
- [8] CE, "EURL | Residues of Pesticides." [Online]. Available: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=100&Lang=EN>. [Accés: 12-Feb-2020].
- [9] CE, "REGLAMENTO (CE) NO 396/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo,"

- Estrasburgo, Feb. 2005. [Accés: 10-Feb-2020].
- [10] CE, "EU Pesticides database - European Commission," 07-Apr-2016. [Online]. Available: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=product.selection&language=EN>. [Accés: 15-Feb-2020].
- [11] CE, "EU Pesticides database - European Commission," 07-Apr-2016. [Online]. Available: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>. [Accés: 17-Feb-2020].
- [12] PAN, "What's On My Food? :: Pesticides On Food," *Pesticide Action Network North America*. [Online]. Available: <http://www.whatsonmyfood.org/>. [Accés: 18-Feb-2020].
- [13] CE, "EURL | Residues of Pesticides | Method information and validation data published by EURLs," 15-Jul-2010. [Online]. Available: [https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?CntID=761&LabID=100&Lang=EN](https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=761&LabID=100&Lang=EN). [Accés: 19-Feb-2020].
- [14] U. de A. Generalitat Valenciana, "EURL-FV Multiresidue Method using QuEChERS followed by GC-QqQ/MS/MS and LC-QqQ/MS/MS for Fruits and Vegetables," 2010. [Accés: 20-Feb-2020].
- [15] EURL, "EURL-FV Multiresidue Method using Mini-Luke followed by GC-QqQ-MS/MS for Fruits and Vegetables," 2010. [Accés: 20-Feb-2020].
- [16] EURL, "EURL-FV Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1," 2010. [Accés: 21-Feb-2020].
- [17] NVWA, "Dutch mini-Luke ('NL-') extraction method followed by LC and GC-MS/MS for multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables Method developed by NVWA, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, NRL for Pesticide Residues in Food an," 2014. [Accés: 21-Feb-2020].
- [18] EURL, "Pesticide analysis in fruit and vegetables by microflow liquid chromatography

- coupled to mass spectrometry,” 2014. [Accés: 24-Feb-2020].
- [19] EURL, “High-resolution accuracy-mass method for the screening of a wide range of pesticides in different fruit and vegetable matrices,” 2014. [Accés: 24-Feb-2020].
- [20] INECC, “IPRODIONA DATOS DE IDENTIFICACIÓN Nombre químico (IUPAC): 3-(3.” [Accés: 9-Mar-2020].
- [21] Phenomenex, “Una solución más sencilla de QuEChERS para análisis de multi residuos en alimentos,” 2012. [Accés: 12-Mar-2020].
- [22] CromLab, “Extracción en Fase Sólida: QuEChERS,” *CromLabS.L.*, 2014. [Online]. Available: [http://www.cromlab.es/EFS\\_INT\\_Quechers.htm](http://www.cromlab.es/EFS_INT_Quechers.htm). [Accés: 14-Mar-2020].
- [23] I. M. Huérfano Barco and J. A. Guerrero Dallos, “Método cualitativo rápido (screening) para la detección de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas,” *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 47, no. 1, pp. 16–26, 2018. [Accés: 16-Mar-2020].